



## Volume Variation of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Juice and Peel Extract Toward the Characteristic and Antibacterial Activity of Nanosilver

David Sarono Putro\*, Dian Eka Ermawati, Adi Yugutama

Department of Pharmacy, Mathematics and Natural Science Faculty,  
 Universitas Sebelas Maret, Jalan Ir. Sutami 36 A Ketingan, Jebres, Surakarta 57126

Submitted 15 October 2020; Revised 8 December 2021; Accepted 8 December 2022; Published 25 February 2022

\*Corresponding author: [davidsaronoputro@gmail.com](mailto:davidsaronoputro@gmail.com)

### Abstract

Biosynthesis of nanosilver by using sweet orange (*C. sinensis*) as a bioreductor has shown nano-sized results. In this research, the effect of volume variation of sweet orange juice and peel extract combination toward the characteristics and antibacterial activity of synthesized nanosilver will be studied. Solution of AgNO<sub>3</sub> 1 mM was mixed with a combination of sweet orange juice – peel extract with ratios (v/v), 3:0; 1.5:1.5; 1:2; 0.5:2.5 and 0:3 at 60°C for 45 minutes. The color change of the mixed solution indicated the formation of nanosilver and confirmed by using UV/Vis spectrophotometer and TEM analysis. The results show that the addition of sweet orange juice in combination accelerated the color change of the mixed solution. The characterization of nanosilver with UV/Vis spectrophotometer confirmed SPR peak at 438-459 nm. The stability test showed that nanosilver reduced with sweet orange juice-peel extract 0,5:2,5 (v/v) was stable and had inhibition diameter tested by the diffusion method against *S.aureus* (19.50 mm) and *S.epidermidis* (18.09 mm), indicates a moderate inhibition. Its TEM analysis confirmed the particle's size of about 30-56 nm with spherical form.

**Keywords:** nanosilver, biosynthesis, *Citrus sinensis*, characteristic, antibacterial activity.

### Variasi Volume Sari Buah dan Infusa Kulit Buah Jeruk (*Citrus sinensis*) Terhadap Karakteristik dan Aktivitas Antibakteri Nanosilver

#### Abstrak

Biosintesis nanosilver dengan buah jeruk (*C. sinensis*) sebagai bioreduktor diketahui dapat menghasilkan perak berukuran nano. Penelitian ini bertujuan melihat pengaruh variasi volume kombinasi sari buah dengan infusa kulit buah jeruk terhadap karakteristik dan aktivitas antibakteri nanosilver. Sintesis nanosilver dilakukan dengan mencampur larutan AgNO<sub>3</sub> 1 mM dengan kombinasi sari buah – infusa kulit buah jeruk dengan perbandingan (v/v), 3:0; 1,5:1,5; 1:2; 0,5:2,5 dan 0:3 pada penangas air bersuhu 60°C selama 45 menit. Perubahan warna larutan mengindikasikan telah terbentuknya nanosilver dan konfirmasi dilakukan dengan spektrofotometer UV/Vis serta analisis TEM. Hasil penelitian menunjukkan penambahan sari buah pada bioreduktor kombinasi dapat mempercepat terjadinya perubahan warna dan karakterisasi nanosilver dengan spektrofotometer UV/Vis mengkonfirmasi puncak SPR direntang 438-459 nm. Pengujian stabilitas memperlihatkan nanosilver hasil reduksi dengan kombinasi sari buah – infusa kulit buah jeruk 0,5:2,5 (v/v) memiliki stabilitas paling memenuhi syarat dan pengujian zona hambat dengan metode difusi terhadap bakteri *S.aureus* (19,50 mm) dan *S.epidermidis* (18,09 mm) yang dihasilkan lebih besar daripada nanosilver hasil reduksi kombinasi formula lainnya, yang mengindikasikan respon hambat sedang. Analisis TEM menunjukkan nanosilver berukuran 30-56 nm berbentuk bulat.

**Kata Kunci:** nanosilver, biosintesis, *Citrus sinensis*, karakteristik, aktivitas antibakteri.

## 1. Pendahuluan

Nanosilver merupakan salah satu nanomaterial yang saat ini paling banyak digunakan baik dalam produk perawatan kesehatan, kosmetik, industri makanan, peralatan medis, hingga peralatan elektronik.<sup>1</sup> Selain itu, telah ditemukan bahwa silver merupakan logam dengan aktivitas antibakteri yang paling efektif dan yang paling sedikit toksik pada sel hewan bila dibandingkan dengan logam lain yang juga memiliki aktivitas antibakteri. Silver umumnya digunakan dalam bentuk nitrat untuk menginduksi efek antibakteri. Namun, ketika silver dibuat menjadi nanopartikel maka terjadi peningkatan pada luas area kontak dengan bakteri yang menyebabkan aktivitas antibakteri menjadi lebih efektif.<sup>2</sup>

Berbagai metode telah dikembangkan untuk menghasilkan nanopartikel logam, yaitu dengan teknik fisika, seperti ablasi laser, litografi, dan iradiasi energi tinggi ataupun dengan teknik kimia, seperti penggunaan bahan pereduksi kimia, elektrokimia, dan reduksi fotokimia. Akan tetapi, kedua teknik yang digunakan untuk sintesis nanopartikel logam ini sering kali sangat mahal dan tidak ramah lingkungan, karena penggunaan bahan kimia berbahaya, bersifat toksik, dan mudah terbakar serta dibutuhkannya energi yang tinggi.<sup>3</sup> Metode lain sebagai alternatif untuk sintesis nanopartikel logam adalah teknik biologi dengan salah satunya menggunakan ekstrak tumbuhan. Tumbuhan dipilih karena merupakan bahan yang ramah lingkungan dan hemat biaya serta bagian-bagian tumbuhan dapat dimanfaatkan seperti daun, akar, batang, biji, dan buah untuk sintesis nanopartikel. Selain itu, ekstrak tumbuhan dapat bekerja dengan baik pada biosintesis nanopartikel logam karena komponen-komponen yang terkandung secara alami dalam ekstrak tumbuhan, seperti gula pereduksi, keton/aldehid, gugus amin, senyawa heterosiklik larut air, dan protein baik berperan sebagai reducing agents atau agen pereduksi yang mereduksi ion logam maupun sebagai capping agents atau agen penstabil yang menjaga stabilitas nanopartikel logam.<sup>4,5</sup>

Hasil penelitian Kaviya et al (2011)

menyatakan bahwa, kulit buah jeruk manis (*C. sinensis*) dapat dimanfaatkan sebagai bioreduktor dalam biosintesis nanosilver dengan dihasilkan nanosilver berukuran  $10 \pm 1$  nm untuk reaksi pada suhu  $60^\circ\text{C}$  selama 45 menit. Pengembangan penelitian ini selanjutnya dilakukan oleh Kahrilas et al (2014), dengan kulit buah jeruk manis sebagai bioreduktor dan pemanasan dengan bantuan microwave saat proses biosintesis, di mana didapatkan nanosilver berukuran  $7,36 \pm 8,06$  nm dengan durasi sintesis selama 15 menit. Selain kulit buah jeruk manis, sari buah jeruk manis juga telah dimanfaatkan sebagai bioreduktor dalam biosintesis nanosilver. Sari buah jeruk manis digunakan sebagai bioreduktor, karena di dalam sari buah jeruk manis terkandung asam sitrat dan asam askorbat yang memiliki kemungkinan untuk berperan sebagai pereduksi ion logam serta sebagai penstabil yang efektif dalam sintesis nanopartikel logam.<sup>6,7</sup>

Meskipun demikian, stabilitas ukuran partikel nanosilver yang dihasilkan dari penelitian yang dilakukan baik oleh Kaviya et al (2011) maupun Kahrilas et al (2014) belum diamati. Di sisi lain, pemanfaatan seluruh bagian buah jeruk manis seperti sari buah dengan kulit buah jeruk manis dalam bentuk kombinasi sebagai bioreduktor dalam biosintesis nanosilver juga belum pernah dilakukan sebelumnya. Kombinasi kedua bagian buah jeruk manis ini sebagai bioreduktor dapat menjadi pilihan alternatif dan sangat berpotensi dalam sintesis nanosilver karena terdapat bukti bahwa pada buah jeruk manis, komposisi fitokimia yang terkandung bervariasi antar bagian buah. Minyak atsiri, gula, asam organik, asam fenolik, dan flavonoid merupakan senyawa-senyawa yang dapat ditemukan di dalam sari buah jeruk manis. Sedangkan dalam kulit buah jeruk manis dapat ditemukan senyawa-senyawa seperti asam fenolik, asam organik, flavonoid, peptida, dan minyak atsiri.<sup>8,9,10</sup> Oleh karena itu, dalam penelitian ini sari buah dan infusa kulit buah jeruk manis akan dikombinasikan untuk memanfaatkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam buah jeruk manis secara maksimal sebagai agen pereduksi serta

agen penstabil dalam biosintesis nanosilver dengan harapan mendapatkan nanosilver yang stabil dan waktu perubahan warna reaksi relatif singkat dengan ukuran partikel serta aktivitas antibakteri nanosilver terhadap bakteri *S. aureus* dan bakteri *S. epidermidis* yang dihasilkan lebih baik bila dibandingkan dengan nanosilver hasil biosintesis yang hanya menggunakan bioreduktor sari buah atau ekstrak kulit buah jeruk manis saja.

## 2. Metode

### 2.1. Alat

*Spektrofotometer UV/Vis* (Genesys, Thermo Fisher Scientific: Waltham, MA), timbangan analitik (Mettler Toledo AL204, d=0,0001 g, Columbus, Ohio), timbangan digital (Precisa XB620C, d=0,01 g, Moosmattstrasse, Swiss), sentrifugator (Heraeus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific, Jerman), TEM (JEM-1400 Flash Electron Microscope, Jeol, Jepang), *hot plate* (Maspion, Indonesia), cawan porselen, batang pengaduk, penangas air, *termometer*, flakon, dan alat-alat gelas.

### 2.2. Bahan

Buah jeruk manis Pacitan (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck diambil dari Kab pacitan, Jawa Tengah bulan April 2020 dan diidentifikasi di Laboratorium taksonomi tumbuhan, Fakultas Biologi UGM Yogyakarta dengan no voucher sepsimen No 014953/S. Tb/II/2020.

Aqua bidestilata, *silver nitrate* 99,8% (Merck yang dikemas ulang oleh CV Nitra Kimia, Yogyakarta), NaOH, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, nutrien agar, standar cakram klindamisin (Oxoid, DA-2), dan aqua destilata.

### 2.3. Prosedur Penelitian

#### 2.3.1. Preparasi Sari Buah dan Infusa Kulit Buah Jeruk Manis

Sari buah jeruk manis diperoleh dengan memeras buah jeruk manis untuk mendapatkan sari buah yang kemudian disaring dengan kertas saring. Sari buah yang diperoleh, disentrifugasi dengan kecepatan

10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dikumpulkan dan kemudian digunakan sebagai sari buah jeruk manis.<sup>6</sup>

Sementara itu, infusa kulit buah jeruk manis diperoleh dengan merebus kulit buah jeruk manis dalam aqua bidestilata mendidih. Sebanyak 4 g kulit buah jeruk yang telah dibersihkan dan dipotong, dimasukkan ke dalam 40 mL aqua bidestilata mendidih selama 2 menit. Larutan infusa yang diperoleh selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No. 1 dan dikumpulkan untuk kemudian digunakan sebagai infusa kulit buah jeruk manis.<sup>11</sup>

#### 2.3.2. Biosintesis Nanosilver

Biosintesis nanosilver dilakukan dengan mencampurkan sebanyak 3 mL bioreduktor kombinasi ke dalam 40 mL larutan AgNO<sub>3</sub> 1 mM. Proses biosintesis dilakukan di atas penangas air yang telah diatur suhunya sebesar 60 °C, dengan waktu pemanasan selama 45 menit.<sup>11</sup> Perbandingan volume sari buah dengan infusa kulit buah jeruk manis dalam bioreduktor kombinasi divariasikan sebagai variabel bebas. Formula bioreduktor kombinasi yang digunakan antara lain dengan perbandingan sebagai berikut (v/v), 3:0; 1,5:1,5; 1:2; 0,5:2,5 dan 0:3.

#### 2.3.3. Karakterisasi Nanosilver

Reseptor yang digunakan dalam penelKarakterisasi nanosilver hasil biosintesis dilakukan dengan pengamatan menggunakan instrumen *Spektrofotometer UV/Vis* dan TEM. *Spektrofotometer UV/Vis* digunakan untuk mengkonfirmasi terbentuknya nanosilver dari hasil biosintesis, yaitu dengan melihat posisi panjang gelombang maksimal ( $\lambda_{maks}$ ) pada spektra absorbansi. Larutan kombinasi sari buah dan infusa kulit buah jeruk manis digunakan sebagai blanko. Sampel diukur dengan panjang gelombang antara 200 sampai 800 nm. Sementara itu, TEM digunakan untuk melihat morfologi nanosilver, yaitu bentuk dan ukuran partikelnya.<sup>12,13</sup>

#### 2.3.4. Uji Stabilitas Nanosilver

Pengujian stabilitas ukuran partikel nanosilver dilakukan dengan melihat ada

atau tidaknya pergeseran  $\lambda_{\text{maks}}$  pada spektra absorbansi spektrofotometer UV/Vis setelah nanosilver disimpan pada periode waktu tertentu. Nanosilver hasil biosintesis disimpan ke dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C selama satu bulan. Pada hari ke-1, 7, 14, 21, dan 29 penyimpanan dilakukan scanning spektra absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis.<sup>5,13</sup>

Sementara itu, untuk melihat pengaruh pH media terhadap stabilitas nanosilver yang dihasilkan, maka dilakukan penyesuaian nilai pH media (6, 8, dan 10) dengan penambahan 0,1 mol/L NaOH ke dalam nanosilver hasil biosintesis kombinasi sari buah dan infusa kulit buah jeruk manis.<sup>14</sup>

### 2.3.5. Uji Aktivitas Antibakteri Nanosilver

Pengujian aktivitas antibakteri nanosilver dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. Media nutrisi agar yang telah disiapkan, ke dalamnya masing-masing strain bakteri dikulturkan dengan meratakannya menggunakan batang ose steril. Selanjutnya, sumuran dengan diameter 10 mm dibuat pada media dan sebanyak 100  $\mu\text{L}$  larutan nanosilver dan aqua destilata sebagai kontrol negatif dimasukkan ke dalamnya. Standar cakram klindamisin, kemudian dipilih untuk digunakan sebagai kontrol positif. Setelah dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, zona hambat bakteri yang terbentuk diukur.<sup>11</sup>

### 2.3.6. Analisis Data

Data dari hasil penelitian, antara lain data  $\lambda_{\text{maks}}$  dari karakterisasi spektrofotometer UV/Vis diuji secara statistik dengan *Kruskal-Wallis Test*. Sementara itu,  $\lambda_{\text{maks}}$  uji stabilitas nanosilver kelima formula selama satu bulan penyimpanan dan pengaruh penyesuaian

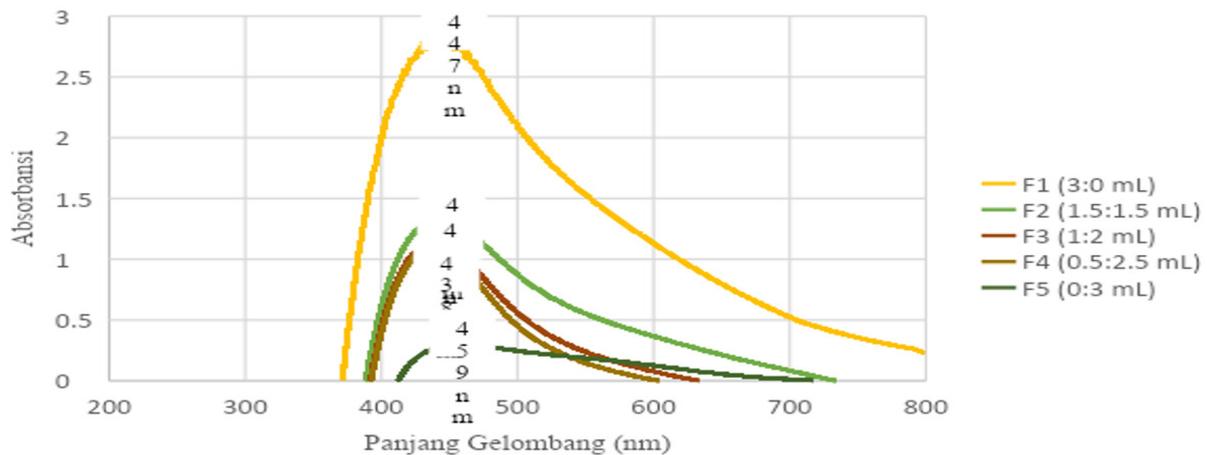
pH terhadap stabilitas  $\lambda_{\text{maks}}$  nanosilver diuji secara statistik dengan *Wilcoxon Test*. Pengujian statistik yang dilakukan seluruhnya menggunakan software SPSS v. 25.0. Nilai rata-rata dan standar deviasi didapatkan dari 3 replikasi pengujian sampel.<sup>15</sup>

## 3. Hasil

Biosintesis nanosilver dalam penelitian eksperimental ini, dilakukan dengan mencampurkan bioreduktor kombinasi sari buah – infusa kulit buah jeruk manis F1 (3:0 mL), F2 (1,5:1,5 mL), F3 (1:2 mL), F4 (0,5:2,5 mL) dan F5 (0:3 mL) pada larutan  $\text{AgNO}_3$  1 mM dan direaksikan di atas penangas air yang telah diatur suhunya sebesar 60 °C, dengan waktu reaksi selama 45 menit. Berdasarkan pengamatan, tiap formula menunjukkan peristiwa perubahan warna larutan yang cukup berbeda antar formula. Data waktu perubahan warna dan warna yang teramati kelima formula nanosilver dapat dilihat di Tabel 1. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semakin banyak sari buah jeruk manis (F1) yang digunakan semakin cepat perubahan warna larutan yang terjadi (setelah 5 menit reaksi dimulai), serta semakin pekat warna larutan yang dihasilkan. Sebaliknya, semakin banyak infusa kulit buah jeruk manis (F5) yang digunakan perubahan warna larutan semakin mendekati (9 menit) dengan hasil dari penelitian yang dilakukan oleh Kaviya et al (2011), serta warna larutan yang dihasilkan tidak terlalu pekat. Hal ini terjadi kemungkinan disebabkan oleh karena adanya perbedaan profil fitokimia antara yang terkandung dalam sari buah dengan yang terkandung dalam kulit buah jeruk manis. Sebagai perbandingan, asam sitrat dan asam askorbat ditemukan lebih banyak

**Tabel 1.** Waktu Perubahan Warna Nanosilver 5 Formula

Formula	Waktu Perubahan Warna	Warna yang Teramati
F1	5 menit	Cokelat pekat
F2	5 menit	Cokelat muda
F3	9 menit	Oranye pekat
F4	9 menit	Oranye bening
F5	9 menit	Kuning bening



**Gambar 1.** Spektra Absorbansi Nanosilver 5 Formula

di dalam sari buah daripada di dalam kulit buah jeruk manis.<sup>8,10</sup> Sebaliknya, senyawa-senyawa flavonoid seperti hesperidin, lebih banyak ditemukan di dalam kulit buah jeruk manis.<sup>16</sup> Selain itu, dalam buah jeruk manis dapat juga ditemukan golongan senyawa lain yang terkandung pada satu bagian tapi tidak terkandung di bagian lain pada buah jeruk manis, misalnya karbohidrat/gula yang banyak ditemukan hanya di sari buah atau peptida yang banyak ditemukan hanya di kulit buah.<sup>9</sup>

Karakterisasi nanosilver dengan *spektrofotometer UV/Vis* selanjutnya dilakukan dengan tujuan untuk mengkonfirmasi terbentuknya nanosilver dari hasil biosintesis dengan menggunakan bioreduktor kombinasi sari buah dan infusa kulit buah jeruk manis (*C. sinensis*), yaitu dengan menganalisis posisi  $\lambda_{maks}$  nanosilver pada spektra absorbansi tiap formula yang hasil *scanning* dapat dilihat di Gambar 1. Berdasarkan hasil *scanning*, didapatkan posisi  $\lambda_{maks}$  nanosilver F1, F2, F3, F4, dan F5 secara berurutan yaitu 447, 443, 439, 438, dan 459 nm. Pengujian statistik yang dilakukan terhadap data  $\lambda_{maks}$  karakterisasi nanosilver lima formula dengan *spektrofotometer UV/Vis* menunjukkan bahwa dari uji normalitas, mayoritas data tidak terdistribusi secara normal yang dilihat dari nilai *Sig. Shapiro-Wilk* sebesar  $0,000 < 0,05$ . Dengan demikian, untuk melihat perbedaan rata-rata posisi  $\lambda_{maks}$  nanosilver antar kelima formula maka dilakukan pengujian statistik non parametrik dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test*. Berdasarkan dari uji statistik yang dilakukan

dengan *Kruskal-Wallis Test*, didapatkan nilai *Asymp. Sig.* sebesar  $0,011 < 0,05$  yang dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan hasil yang signifikan secara statistik antar kelima formula. Dengan demikian, hasil karakterisasi nanosilver dengan *spektrofotometer UV/Vis* ini menunjukkan bahwa kelima formula bioreduktor kombinasi dapat digunakan sebagai bioreduktor untuk biosintesis nanosilver dengan karakteristik posisi  $\lambda_{maks}$  nanosilver yang cukup berbeda antar formula. Oleh karena itu, untuk melihat lebih jelas pengaruh variasi volume kombinasi sari buah dan infusa kulit buah jeruk manis sebagai bioreduktor terhadap karakteristik nanosilver yang dihasilkan maka pengujian stabilitas nanosilver kelima formula bioreduktor kombinasi dilakukan.

Stabilitas ukuran partikel nanosilver dari hasil biosintesis dengan bioreduktor kombinasi sari buah – infusa kulit buah jeruk manis (F1, F2, F3, F4, dan F5) diamati selama satu bulan penyimpanan. Pengamatan stabilitas nanosilver dilakukan dalam beberapa waktu, yaitu hari ke-1, 7, 14, 21 dan 29 penyimpanan setelah proses biosintesis. Posisi  $\lambda_{maks}$  digunakan sebagai salah satu parameter yang dianalisis untuk menentukan stabilitas kelima formula nanosilver. Selain itu, pengamatan fisik pada larutan juga dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya aglomerat yang terbentuk selama penyimpanan. Data posisi  $\lambda_{maks}$  nanosilver kelima formula selama satu bulan penyimpanan dapat dilihat di Tabel 2. Berdasarkan dari hasil yang didapat terlihat bahwa selama satu bulan penyimpanan, posisi  $\lambda_{maks}$  nanosilver kelima formula mengalami

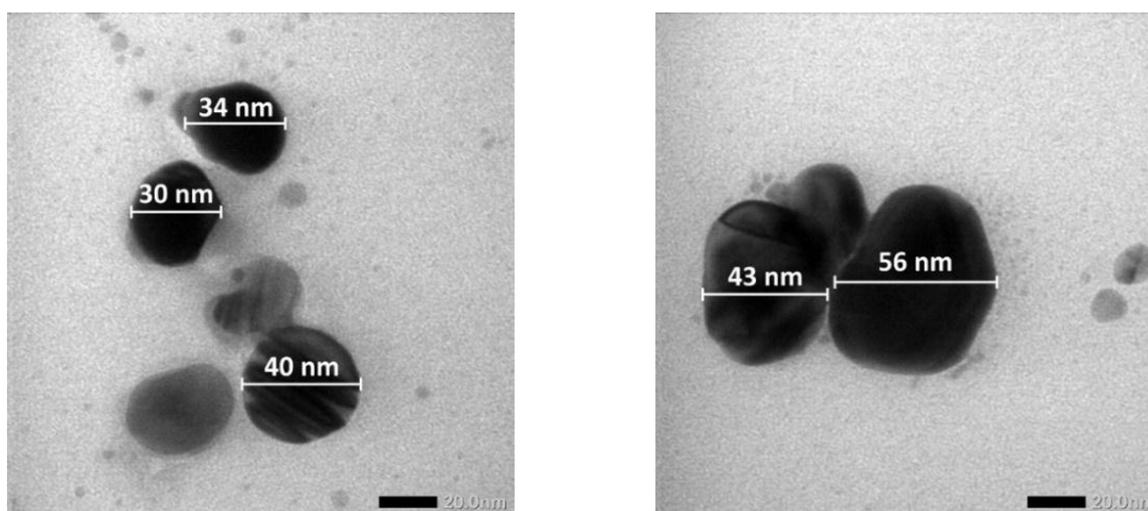
**Tabel 2.** Panjang Gelombang Maksimal Nanosilver 5 Formula Selama Satu Bulan Penyimpanan

Formula	Panjang Gelombang (nm)				
	Hari-1	Hari-7	Hari-14	Hari-21	Hari-29
F1	447 ± 3	442 ± 2	448 ± 1	448 ± 2	446 ± 1
F2	443 ± 1	444 ± 1	448 ± 2	451 ± 3	451 ± 3
F3	439 ± 1	441 ± 2	439 ± 1	441 ± 1	440 ± 1
F4	438 ± 1	442 ± 1	438 ± 1	442 ± 1	440 ± 1
F5	459 ± 0	463 ± 2	453 ± 0	453 ± 1	452 ± 1

pergeseran cukup beragam. Fluktuasi posisi  $\lambda$  maks lebih dari 1-4 nm terlihat terjadi pada nanosilver F1, F2, dan fluktuasi paling besar terjadi pada nanosilver F5. Pengujian statistik yang dilakukan terhadap data stabilitas posisi  $\lambda$  maks nanosilver kelima formula menunjukkan bahwa dari uji normalitas, data F5 tidak terdistribusi secara normal yang dilihat dari nilai *Sig. Shapiro-Wilk* sebesar  $0,04 < 0,05$ . Dengan demikian, pengujian statistik non parametrik menggunakan Wilcoxon Test dipilih untuk membandingkan antara rata-rata posisi  $\lambda$  maks nanosilver hasil biosintesis menggunakan bioreduktor kombinasi sari buah dan infusa kulit buah jeruk manis (F2, F3, dan F4) dengan rata-rata posisi  $\lambda$  maks nanosilver hasil biosintesis menggunakan bioreduktor sari buah jeruk manis saja (F1) atau infusa kulit buah jeruk manis saja (F5) selama satu bulan penyimpanan. Hasil Wilcoxon Test antara nanosilver F2, F3 dan F4 terhadap nanosilver F5 menunjukkan nilai *Asymp. Sig.* sebesar  $0,01 < 0,05$  yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antara rata-rata posisi  $\lambda$  maks nanosilver F2, F3 dan F4 dengan rata-rata posisi  $\lambda$  maks nanosilver F5. Sementara itu, hasil *Wilcoxon Test* yang serupa juga ditunjukkan antara nanosilver F3 dan F4 terhadap nanosilver F1 yaitu nilai *Asymp. Sig.* sebesar  $0,01 < 0,05$ . Sedangkan, untuk hasil Wilcoxon Test antara nanosilver F2 terhadap nanosilver F1 menunjukkan nilai *Asymp. Sig.* sebesar  $0,355 > 0,05$  yang menandakan bahwa penambahan sari buah jeruk manis sebanyak 1,5 mL untuk dikombinasikan dengan infusa kulit buah jeruk manis sebanyak 1,5 mL sebagai bioreduktor tidak memberikan perbedaan signifikan secara statistik bila dibanding dengan penggunaan sari buah jeruk manis saja (F1) sebagai bioreduktor.

Sementara itu, dari hasil pengamatan fisik larutan kelima formula nanosilver didapatkan bahwa pada hari ke-7 setelah biosintesis, terlihat aglomerat terbentuk pada dasar flakon larutan nanosilver F2 dan paling banyak pada larutan nanosilver F1.

Pengujian pengaruh pH terhadap stabilitas ukuran partikel nanosilver selama satu bulan penyimpanan juga dilakukan dalam penelitian eksperimental ini untuk melihat adakah perbedaan yang dihasilkan dengan adanya penyesuaian pH. Pengujian diterapkan kepada dua formula variasi volume kombinasi sari buah dan infusa kulit buah jeruk, yaitu F3 dan F4 yang telah terbukti nanosilver yang dihasilkan memiliki stabilitas yang baik. Kedua formula bioreduktor yang dipilih, setelah melalui proses biosintesis nanosilver kemudian disesuaikan pH larutan menjadi pH 6, 8, dan 10. Berdasarkan hasil pengujian, dapat dilihat bahwa dari kedua formula dengan semakin meningkatnya pH semakin terjadi pergeseran  $\lambda$  maks ke pergeseran biru/blueshift. Dengan demikian, peningkatan pH yang diberikan untuk kedua formula tidak dapat menjaga stabilitas nanosilver selama satu bulan penyimpanan yang dilihat dari terjadinya fluktuasi posisi  $\lambda$  maks yang tidak teratur pada pH 10. Sementara itu pada pH 8, posisi  $\lambda$  maks nanosilver F4 mengalami fluktuasi yang sedikit lebih besar bila dibanding dengan  $\lambda$  maks nanosilver F3. Sebaliknya pada pH 6, fluktuasi perubahan nilai  $\lambda$  maks untuk kedua formula tidak lebih dari 1-4 nm yang mengkonfirmasi bahwa nanosilver dari hasil biosintesis dengan bioreduktor F3 dan F4 pada pH 6 stabil selama satu bulan penyimpanan. Sementara itu, *Wilcoxon Test* juga dipilih pada analisis data pengujian pengaruh pH ini untuk mengetahui adakah perbedaan yang signifikan secara statistik



**Gambar 2.** Citra TEM Nanosilver F4

antara formula kontrol (pH 6) dengan formula yang disesuaikan pH-nya (pH 8 dan pH 10). Wilcoxon Test dipilih karena data posisi  $\lambda$ maks pengaruh pH menunjukkan nilai Sig. Shapiro-Wilk  $< 0,05$  untuk F4 pH 6 dan pH 8 yang berarti bahwa data tidak terdistribusi normal. Berdasarkan hasil *Wilcoxon Test* rata-rata posisi  $\lambda$ maks nanosilver F3 pH 8 terhadap F3 pH 6 serta rata-rata posisi  $\lambda$ maks nanosilver F4 pH 8 dan pH 10 terhadap F4 pH 6 menunjukkan nilai *Asymp. Sig.* sebesar  $0,01 < 0,05$  yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik saat dilakukan penyesuaian pH terhadap rata-rata posisi  $\lambda$ maks nanosilver selama satu bulan penyimpanan.

Pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian eksperimental ini, dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri nanosilver dari hasil biosintesis dengan bioreduktor F3 dan F4 yang telah terbukti stabil selama satu bulan penyimpanan terhadap bakteri *S.aureus* dan *S.epidermidis*. Metode difusi sumuran digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri nanosilver dengan diameter zona hambat sebagai parameter yang diukur. Data diameter zona hambat aktivitas antibakteri untuk

nanosilver F3 dan F4 dapat dilihat di Tabel 3. Data hasil pengujian memperlihatkan bahwa nanosilver hasil biosintesis baik dengan bioreduktor F3 maupun F4 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S.aureus* dan *S.epidermidis* dengan dilihat dari terbentuknya zona hambat untuk masing-masing bakteri uji. Berdasarkan pengujian yang dilakukan, nanosilver F3 menghasilkan diameter zona hambat sebesar 19,20 mm terhadap bakteri *S.aureus* dan 18,19 mm terhadap bakteri *S.epidermidis*, sedangkan nanosilver F4 menghasilkan diameter zona hambat sebesar 19,50 mm terhadap bakteri *S.aureus* dan 18,09 mm terhadap bakteri *S.epidermidis*.

Analisis dengan menggunakan TEM atau *Transmission Electron Microscope* digunakan sebagai tahapan karakterisasi akhir dalam penelitian eksperimental ini untuk melihat morfologi nanosilver dari hasil biosintesis, yang meliputi bentuk dan ukuran partikel. Gambar 2 memperlihatkan citra hasil pengamatan dengan TEM yang mengkonfirmasi terbentuknya nanosilver dari hasil biosintesis dengan menggunakan bioreduktor F4 (0,5:2,5 mL). Nanosilver yang

**Tabel 3.** Diameter Zona Hambat Aktivitas Nanosilver F3 dan F4

Sampel Uji	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (A)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (B)
F3	19,20	18,19
F4	19,50	18,09
K+	31,38	33,26
K-	0	0

dihasilkan berbentuk bulat dengan ukuran partikel terkecil 30 nm sampai ukuran partikel terbesar 56 nm.

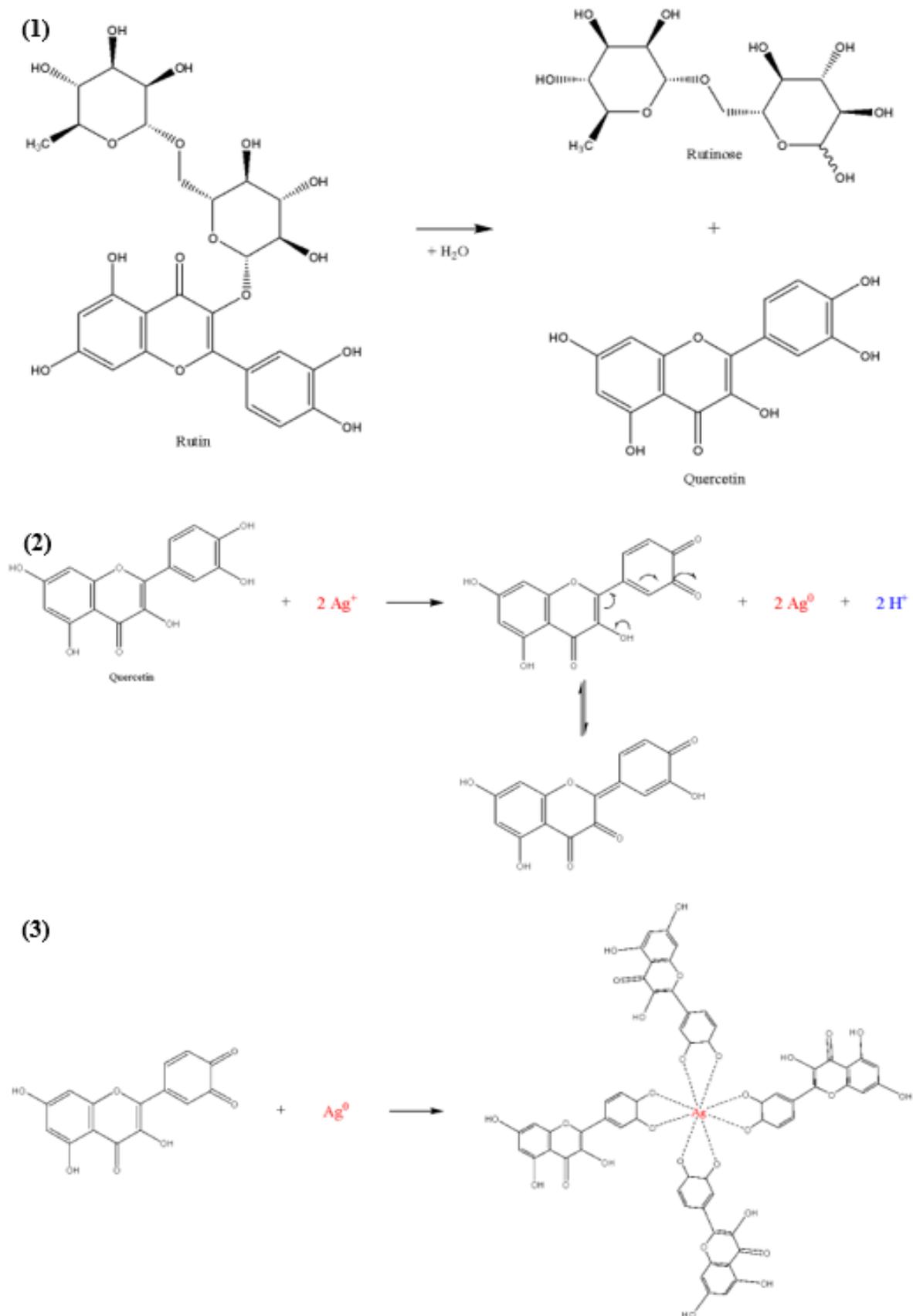
#### 4. Pembahasan

Selama proses biosintesis nanosilver, pengamatan dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya peristiwa perubahan warna pada larutan. Pengamatan ini dilakukan, karena perubahan warna pada larutan saat proses biosintesis merupakan salah satu indikator dari terbentuknya nanosilver dalam larutan.<sup>17</sup> Peristiwa perubahan warna saat proses biosintesis juga disebutkan pada penelitian yang dilakukan oleh Kaviya et al (2011), di mana reaksi bioreduksi  $\text{Ag}^+$  dengan penggunaan 3 mL ekstrak kulit buah jeruk manis (*C. sinensis*) pada suhu 60 °C menunjukkan perubahan warna dari larutan tidak berwarna menjadi larutan berwarna kuning kecokelatan setelah 10 menit yang menandakan hadirnya nanosilver dalam larutan. Terbentuknya nanosilver dari reduksi ion logam  $\text{Ag}^+$  pada penelitian eksperimental ini, tidak lepas dari peran senyawa-senyawa metabolit yang terkandung dalam buah jeruk manis seperti terpenoid, flavonoid, gula, asam fenolik, polifenol, dan protein. Berdasarkan dari studi-studi sebelumnya, terdapat dugaan bahwa adanya disosiasi proton gugus  $-\text{OH}$  pada senyawa golongan terpenoid memicu terjadinya resonansi struktur kimia yang selanjutnya dapat menghasilkan proses oksidasi senyawa tersebut sehingga ion logam tereduksi dan diikuti dengan pembentukan nanosilver. Di sisi lain, peristiwa transformasi tautomer senyawa golongan flavonoid dari bentuk enol menjadi bentuk keto yang kemungkinan melepaskan hidrogen reaktif, dapat menjadi mekanisme lain dalam pembentukan nanosilver dari ion  $\text{Ag}^+$ . Selain itu, flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa yang mampu mengkelat ion logam seperti ion  $\text{Ag}^+$  sehingga kuat dugaan flavonoid juga terlibat pada proses nukleasi dan agregasi atau fase pertumbuhan nanopartikel. Gugus aldehid yang ditemukan pada monosakarida seperti glukosa, juga diketahui dapat bertindak sebagai agen pereduksi. Adanya proses oksidasi gugus

aldehid yang terdapat pada struktur gula melalui penambahan nukleofil  $-\text{OH}$ , memicu terjadinya reduksi ion logam. Sementara itu, kehadiran senyawa-senyawa seperti protein, polisakarida, ligan organik dan komponen biologi lainnya pada permukaan nanopartikel telah diketahui dapat meningkatkan stabilitas partikel.<sup>18</sup> Dengan demikian, dilakukannya kombinasi antara sari buah dan infusa kulit buah jeruk manis merupakan salah satu upaya untuk memanfaatkan senyawa-senyawa metabolit yang terkandung dalam buah jeruk manis baik sebagai agen pereduksi maupun sebagai agen penstabil. Gambar 3 berikut merupakan salah satu kemungkinan yang dapat menjelaskan mekanisme reaksi reduksi ion silver dan kelasi nanosilver oleh senyawa flavonoid Rutin (*quercetin-3-O-rutinoside*) yang ditemukan pada ekstrak kulit buah jeruk manis untuk membentuk nanosilver yang stabil.<sup>9,10,19,20</sup>

Hasil karakterisasi nanosilver dengan spektrofotometer UV/Vis menunjukkan posisi  $\lambda_{\text{maks}}$  yang bervariasi antar formula. Posisi  $\lambda_{\text{maks}}$  yang bervariasi ini dapat terjadi karena adanya beberapa pengaruh seperti dari ukuran partikel, bentuk nanosilver yang terbentuk, komposisi, dan senyawa penudung yang terdapat dalam larutan nanosilver. Penelitian Paramelle et al (2014) membuktikan bahwa nanosilver berukuran antara 20-100 nm menunjukkan korelasi baik dengan meningkatnya ukuran partikel maka posisi  $\lambda_{\text{maks}}$  akan bergeser ke pergeseran merah/redshift atau panjang gelombang yang lebih besar.

Pengamatan stabilitas nanosilver selanjutnya dilakukan dalam beberapa waktu, yaitu hari ke-1, 7, 14, 21 dan 29 penyimpanan setelah proses biosintesis. Parameter seperti suhu dan cahaya dikondisikan dalam penyimpanan, di mana suhu penyimpanan diatur sebesar 4 °C dan flakon tempat larutan nanosilver disimpan ditutup dengan aluminium foil untuk menghindari paparan cahaya. Pengaturan suhu penyimpanan dan pencegahan nanosilver terpapar cahaya ini dilakukan sebagai salah satu upaya untuk menjaga stabilitas karena nanosilver memperlihatkan stabilitas jangka panjang



**Gambar 3.** Mekanisme Reaksi Reduksi Ion Silver oleh Senyawa Flavonoid

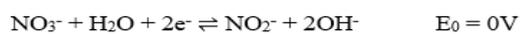
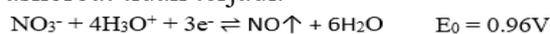
terbaik pada kondisi penyimpanan gelap dengan suhu 5 °C.<sup>5</sup> Berdasarkan dari pengamatan yang dilakukan terlihat bahwa selama satu bulan penyimpanan, posisi λmaks nanosilver kelima formula mengalami

pergeseran cukup beragam yang menunjukkan kemungkinan terjadinya perubahan ukuran partikel.<sup>21</sup> Pergeseran posisi λmaks nanosilver dapat dikatakan relatif konstan atau stabil, apabila selama penyimpanan perubahan

posisi  $\lambda$  maks berkisar antara 1-4.<sup>22</sup> Fluktuasi posisi  $\lambda$  maks lebih dari 1-4 nm terlihat terjadi pada nanosilver F1, F2, dan fluktuasi paling besar terjadi pada nanosilver F5. Hal ini menandakan bahwa dengan bioreduktor F1, F2, dan F5 nanosilver yang terbentuk tidak stabil selama masa satu bulan penyimpanan atau dapat juga diduga nanosilver masih dalam fase pertumbuhan, karena morfologi nanosilver belum terbentuk sempurna dengan ditandai masih terjadinya fluktuasi posisi  $\lambda$  maks.<sup>23</sup> Selain itu, adanya interaksi elektrostatik seperti misalnya peristiwa donor elektron dari oksigen elektronegatif dalam pelarut aqua bidestilata yang digunakan dapat berkontribusi pada terjadinya fluktuasi posisi  $\lambda$  maks.<sup>24</sup> Sementara itu, dari hasil pengamatan fisik larutan kelima formula nanosilver didapatkan bahwa pada hari ke-7 setelah biosintesis, terlihat aglomerat terbentuk pada dasar flakon larutan nanosilver F2 dan paling banyak pada larutan nanosilver F1. Terbentuknya aglomerat pada bagian dasar tempat nanosilver disimpan ini merupakan indikasi awal stabilitas nanosilver yang memburuk.<sup>21</sup> Dengan demikian, semakin banyak sari buah jeruk manis (F1) yang ditambahkan sebagai bioreduktor maka akan memungkinkan banyak aglomerat terbentuk selama waktu penyimpanan yang singkat sehingga akan mempengaruhi stabilitas nanosilver yang dihasilkan. Jadi, dari hasil pengukuran posisi  $\lambda$  maks nanosilver dan pengamatan fisik larutan nanosilver kelima formula selama satu bulan penyimpanan yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa nanosilver dari biosintesis dengan menggunakan bioreduktor F3 dan F4 stabil selama satu bulan penyimpanan dilihat dari pergeseran posisi  $\lambda$  maks yang teramati berkisar tidak lebih dari 1-4 nm serta selama penyimpanan pada dasar flakon tidak terbentuk aglomerat.

Pengujian pengaruh pH selanjutnya dilakukan terhadap dua formula variasi volume kombinasi sari buah dan infusa kulit buah jeruk, yaitu F3 dan F4 yang telah terbukti nanosilver yang dihasilkan memiliki stabilitas yang baik. Pengaruh pH berperan penting dalam potensi reduksi yang dimiliki

oleh senyawa-senyawa dalam ekstrak jeruk terhadap proses reduksi ion silver ( $\text{Ag}^+$ ). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Konwarh et al (2011), dapat dijelaskan bahwa komponen senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kulit buah jeruk tidak efektif untuk mereduksi pada kondisi lingkungan asam. Hal ini dikarenakan adanya stabilisasi struktural senyawa-senyawa tersebut yang utamanya berhubungan dengan ikatan hidrogen, di mana sebagai contoh asam askorbat yang telah dikenal sebagai agen reduksi akan mengalami penurunan potensi reduksinya pada kondisi lingkungan asam. Sementara itu, gugus nitrat dari garam perak pada pH rendah merupakan oksidator kuat dibanding  $\text{Ag}^+$  dan dapat mengoksidasi asam askorbat, sehingga reduksi  $\text{Ag}^+$  oleh asam askorbat tidak terjadi.<sup>14</sup>



Hasil pengujian menunjukkan bahwa dari kedua formula dengan semakin meningkatnya pH semakin terjadi pergeseran  $\lambda$  maks ke pergeseran biru/blueshift. Pergeseran  $\lambda$  maks ke panjang gelombang yang semakin pendek dengan meningkatnya nilai pH ini, juga terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Qin et al (2010). Pada penelitian tersebut, meningkatnya pH akan meningkatkan aktivitas asam askorbat untuk mereduksi  $\text{Ag}^+$  dan dihasilkanlah pergeseran biru yang menandakan pengurangan ukuran rata-rata nanosilver yang terbentuk. Umumnya, asam askorbat pada kondisi netral bertindak sebagai donor elektron stabil dan bersama dengan ion radikal *semidehydroascorbic acid* bertanggung jawab dalam reaksi reduksi  $\text{Ag}^+$  menjadi  $\text{Ag}^0$ .<sup>25</sup> Akan tetapi pada kondisi basa, asam askorbat mengalami ionisasi yang sebagai hasilnya hanya *semidehydroascorbic acid* saja yang bertanggung jawab dalam reduksi  $\text{Ag}^+$  dan dengan demikian saat proses nukleasi untuk membentuk nanosilver hanya sedikit  $\text{Ag}^0$  yang terlibat sehingga ukuran partikel nanosilver yang terbentuk lebih kecil. Adanya penambahan sitrat sebagai penstabil dalam penelitian yang dilakukan oleh Qin et al (2010) tidak menghasilkan perbedaan

selama reduksi  $Ag^+$ , sehingga menguatkan dugaan bahwa reaktivitas asam askorbat yang berperan saat pH diubah. Meskipun demikian, stabilitas nanosilver hasil sintesis dengan reduktor asam askorbat selama penyimpanan dengan adanya pengaruh pH belum dijelaskan. Berdasarkan dari hasil penelitian eksperimental ini, peningkatan pH yang diberikan untuk kedua formula tidak dapat menjaga stabilitas nanosilver selama satu bulan penyimpanan yang dilihat dari terjadinya fluktuasi posisi  $\lambda_{maks}$  yang tidak teratur pada pH 10. Sedangkan pada pH 8, posisi  $\lambda_{maks}$  nanosilver F4 mengalami fluktuasi yang sedikit lebih besar bila dibanding dengan  $\lambda_{maks}$  nanosilver F3. Sebaliknya pada pH 6, fluktuasi perubahan nilai  $\lambda_{maks}$  untuk kedua formula tidak lebih dari 1-4 nm yang mengkonfirmasi bahwa nanosilver dari hasil biosintesis dengan bioreduktor F3 dan F4 pada pH 6 stabil selama satu bulan penyimpanan.

Nanosilver hasil biosintesis baik dengan bioreduktor ekstrak kulit buah jeruk maupun sari buah jeruk manis (*C. sinensis*) telah diketahui menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri-bakteri, seperti *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *B.subtilis*, dan *Shigella*.<sup>7,11,13</sup> Bakteri *S.aureus* dan *S.epidermidis* dipilih sebagai bakteri uji karena keduanya termasuk bakteri *Staphylococcus* yang banyak ditemukan pada kulit manusia dan merupakan patogen yang dapat menyebabkan penyakit infeksi oportunistik.<sup>26,27</sup> Meskipun demikian, kedua bakteri tersebut memiliki karakteristik yang cukup berbeda. Bila bakteri *S.epidermidis* merupakan bakteri *Staphylococcus* golongan coagulase-negatif, maka berbeda halnya dengan bakteri *S.aureus* yang termasuk bakteri *Staphylococcus* golongan coagulase-positif yang bekerja dengan mengurangi enzim coagulase sehingga dapat menyebabkan sakit parah hingga kematian. Di sisi lain, terdapat bukti bahwa strain bakteri *S.epidermidis* tertentu menghasilkan modulin larut fenol yang secara selektif menghambat pertumbuhan patogen kulit serta dapat memodulasi respons imun non spesifik host untuk melawan patogen, seperti

bakteri *S.aureus*.<sup>27,28</sup> Sementara itu, bakteri *S.epidermidis* juga diduga ikut terlibat dalam patofisiologi jerawat melalui interaksi dengan bakteri *P.acnes* atau yang saat ini berganti nama menjadi bakteri *C.acnes*, bakteri utama penyebab jerawat. Pada kulit sehat bakteri *C.acnes* berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus*, sebaliknya saat kolonisasi berlebihan bakteri ini terjadi maka peradangan pada kulit yang menyebabkan terbentuknya jerawat dapat berkembang. Bakteri *S.epidermidis* dan bakteri *C.acnes* keduanya menggunakan gliserol sebagai sumber karbon dalam produksi asam lemak rantai pendek yang berfungsi untuk menjadi agen antimikroba dalam kompetisi satu sama lain sehingga kesetimbangan kedua bakteri pada kulit dapat terjaga. Penggunaan antibakteri topikal seperti eritromisin dan klindamisin monoterapi untuk mengatasi kolonisasi berlebihan bakteri *C.acnes* pada penelitian-penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa tidak hanya jumlah bakteri *C.acnes* yang berkurang, tetapi juga bakteri *S.epidermidis* yang sangat bermanfaat untuk menjaga kesetimbangan flora normal kulit serta menghambat pertumbuhan patogen kulit penyebab penyakit. Selain itu, penggunaan kedua antibakteri topikal tersebut secara berlebihan dapat memicu perkembangan resistensi baik terhadap bakteri *C.acnes* maupun bakteri *S.epidermidis*.<sup>27,29</sup> Dengan demikian, nanosilver hasil biosintesis menggunakan bioreduktor F3 atau F4 diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai agen antibakteri topikal alternatif terhadap bakteri *S.aureus* dan *S.epidermidis* untuk mengatasi jerawat. Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan diameter zona hambat nanosilver F3 dan F4 terhadap bakteri *S.aureus* dan *S.epidermidis* yang terbentuk berada dalam rentang 16-20 mm, di mana respons hambat pertumbuhan agen antibakteri pada rentang ini diklasifikasikan sebagai kategori sedang untuk menghambat pertumbuhan bakteri.<sup>30</sup> Sementara itu, dari hasil pengujian aktivitas antibakteri nanosilver dari biosintesis dengan ekstrak kulit buah jeruk manis saja terhadap bakteri *S.aureus* yang dilakukan oleh Kaviya et al (2011) menunjukkan diameter zona

hambat sebesar 7,8 mm untuk sintesis pada suhu 25 °C dan 9,2 mm untuk sintesis pada suhu 60 °C di mana diameter-diameter zona hambat ini masuk dalam rentang <10 mm dan diklasifikasikan sebagai kategori tidak ada respon hambat pertumbuhan bakteri.<sup>30</sup> Menurut Kaviya et al (2011), diameter zona hambat nanosilver yang kurang dari 10 mm tersebut disebabkan karena bakteri *S.aureus* merupakan bakteri gram-positif yang memiliki struktur dinding sel tebal tersusun dari lapisan peptidoglikan yang mengandung polisakarida berikatan *cross-linked* dengan peptida sehingga membentuk struktur kaku yang menyulitkan nanosilver untuk berpenetrasi ke dalamnya.

Analisis TEM yang dilakukan, mengkonfirmasi terbentuknya nanosilver dari hasil biosintesis dengan menggunakan bioreduktor F4 (0,5:2,5 mL). Nanosilver yang dihasilkan berbentuk bulat dengan ukuran partikel terkecil 30 nm sampai ukuran partikel terbesar 56 nm. Sebagai pembanding, hasil karakterisasi TEM nanosilver dari biosintesis menggunakan ekstrak kulit buah jeruk manis saja yang dilakukan oleh Kaviya et al (2011) didapatkan ukuran partikel sebesar  $35 \pm 2$  nm dengan sintesis pada suhu 25 °C dan ukuran partikel sebesar  $10 \pm 1$  nm dengan sintesis pada suhu 60 °C. Sementara itu, dengan bantuan microwave pada penelitian Kahrilas et al (2014) nanosilver yang didapatkan menunjukkan partikel-partikel dengan diameter yang beragam di mana 56 nm merupakan ukuran partikel terbesar nanosilver yang terukur dan rata-rata ukuran partikel yaitu  $7,36 \pm 8,06$  nm. Sedangkan, karakterisasi TEM nanosilver hasil biosintesis menggunakan ekstrak kulit buah jeruk manis yang dilakukan oleh Annu et al (2018) didapatkan ukuran partikel berkisar antara 9-46 nm. Selain itu, dari hasil penelitian-penelitian yang telah disebutkan, didapatkan kesamaan terhadap jenis distribusi ukuran partikel dan morfologi bentuk nanosilver yang dihasilkan. Karakterisasi TEM nanosilver dari hasil biosintesis dengan menggunakan ekstrak kulit buah jeruk manis (*C. sinensis*) menunjukkan nanosilver terdistribusi secara polidispers dan berbentuk bulat. Sementara

itu, hasil karakterisasi TEM pada penelitian eksperimental ini juga mengkonfirmasi hasil yang serupa, yaitu nanosilver terdistribusi kemungkinan secara polidispers dan berbentuk bulat. Partikel-partikel besar yang ditemukan dari hasil karakterisasi TEM baik pada penelitian-penelitian yang telah disebutkan di atas maupun pada penelitian eksperimental ini, disebabkan karena kandungan senyawa-senyawa dalam bioreduktor yang kompleks dapat memberikan efek signifikan terhadap sifat aglomerasi dan dekomposisi nanosilver yang dihasilkan. Selain itu, suhu reaksi yang dipilih juga merupakan faktor penting untuk bisa mendapatkan ukuran partikel nanosilver yang diinginkan.<sup>17</sup> Dengan demikian, meskipun ukuran partikel nanosilver yang dihasilkan masih masuk dalam kisaran rata-rata dari hasil penelitian-penelitian yang telah disebutkan, hasil karakterisasi TEM yang telah dilakukan pada penelitian eksperimental ini menunjukkan bahwa variasi volume kombinasi sari buah dan infusa kulit buah jeruk manis yang digunakan sebagai bioreduktor dapat mempengaruhi karakteristik ukuran partikel nanosilver yang dihasilkan bila dibandingkan dengan penggunaan ekstrak kulit buah jeruk manis saja sebagai bioreduktor tunggal

## 5. Simpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan penambahan sari buah pada bioreduktor kombinasi dapat mempercepat terjadinya perubahan warna dan karakterisasi nanosilver dengan *spektrofotometer UV/Vis* mengkonfirmasi puncak *Surface Plasmon Resonance* (SPR) direntang 438-459 nm. Pengujian stabilitas memperlihatkan nanosilver hasil reduksi dengan kombinasi sari buah – infusa kulit buah jeruk 0,5:2,5 (v/v) memiliki stabilitas paling memenuhi syarat dan pengujian zona hambat dengan metode difusi terhadap bakteri *S.aureus* (19,50 mm) dan *S.epidermidis* (18,09 mm) yang dihasilkan lebih besar daripada nanosilver hasil reduksi kombinasi formula lainnya, yang mengindikasikan respon hambat sedang. Analisis TEM menunjukkan nanosilver berukuran 30-56 nm bentuk bulat.

**Daftar Pustaka**

1. Rezvani, E., Rafferty, A., McGuinness, C., Kennedy, J. 2019. Adverse Effects of Nanosilver on Human Health and The Environment. *Acta Biomaterial*, 94:145–159.
2. Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, BL., Ikram, S. 2016. A Review on Plants Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles for Antimicrobial Applications: A Green Expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1):17–28.
3. Rai, M., Alves dos Santos, C. 2017. *Nanotechnology Applied To Pharmaceutical Technology*. Springer International Publishing.
4. Hebbalalu, D., Lalley, J., Nadagouda, M N., Varma, RS. 2013. Greener Techniques for The Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers, and Microwaves. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(7):703–712.
5. Velgosova, O., Čížmárová, E., Málek, J., Kavuličova, J. 2017. Effect of Storage Conditions on Long-Term Stability of Ag Nanoparticles Formed via Green Synthesis. *International Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials*, 24(10):1177–1182.
6. Sujitha, MV., Kannan, S. 2013. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Citrus Fruits (*Citrus limon*, *Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) Aqueous Extract and Its Characterization. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102:15–23.
7. Arooj, N., Dar, N., Samra, ZQ. 2014. Letter to the Editor Stable Silver Nanoparticles Synthesis by *Citrus sinensis* (Orange) and Assessing Activity Against Food Poisoning Microbes. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27(10):815–818.
8. Kelebek, H., Selli, S. 2011. Determination of Volatile, Phenolic, Organic Acid and Sugar Components in A Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Orange Juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10):1855–1862.
9. Favela-Hernández, JM., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, MA., Esquivel-Ferriño, PC., Camacho-Corona Mdel, R. 2016. Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, 21(2):247.
10. Liew, SS., Ho, WY., Yeap, SK., Sharifudin, SAB. 2018. Phytochemical Composition and In Vitro Antioxidant Activities of *Citrus sinensis* Peel Extracts. *PeerJ*, 6(8):e5331.
11. Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J., Srinivasan, K. 2011. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Citrus sinensis* Peel Extract and Its Antibacterial Activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(3):594–598.
12. Konwarh, R., Gogoi, B., Philip, R., Laskar, MA., Karak, N. 2011. Biomimetic Preparation of Polymer-Supported Free Radical Scavenging, Cytocompatible and Antimicrobial ‘Green’ Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Citrus sinensis* Peel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2):338–345.
13. Annu., Ahmed, S., Kaur, G., Sharma, P., Singh, S., Ikram, S. 2018. Fruit Waste (Peel) as Bio-Reductant to Synthesize Silver Nanoparticles with Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Journal of Applied Biomedicine*, 16(3):221–231.
14. Qin, Y., Ji, X., Jing, J., Liu, H., Wu, H., Yang, W. 2010. Size Control Over Spherical Silver Nanoparticles by Ascorbic Acid Reduction. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 372(1–3):172–176.
15. Puišo, J., Jonkuvienė, D., Mačionienė, I., Šalomskienė, J., Jasutienė, I., Kondrotas, R. 2014. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Lingonberry and Cranberry Juices and Their Antimicrobial Activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121: 214–221.
16. Celano, R., Campone, L., Pagano, I., Carabetta, S., DiSanzo, R., Rastrelli,

- L., Piccinelli, AL., Russo, M. 2019. Characterisation of Nutraceutical Compounds from Different Parts of Particular Species of *Citrus sinensis* 'Ovale Calabrese' by UHPLC-UV-ESI-HRMS. *Natural Product Research*, 33(2):244–251.
17. Kahrilas, GA., Wally, LM., Fredrick, SJ., Hiskey, M., Prieto, AL., Owens, JE. 2014. Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Orange Peel Extract. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(3):367–376.
18. Makarov, VV., Love, AJ., Sinitsyna, OV., Makarova, SS., Yaminsky, IV., Taliansky, ME., Kalinina, NO. 2014. "Green" Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Acta Naturae*, 6(1):35-44.
19. Aziz, SB., Hussein, G., Brza, MA., Mohammed, SJ., Abdulwahid, RT., Raza, SS., Hassanzadeh, A. 2019. Fabrication of Interconnected Plasmonic Spherical Silver Nanoparticles with Enhanced Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Peaks Using Quince Leaf Extract Solution. *Nanomaterials*, 9(11):1557.
20. Kapešová, J., Petrášková, L., Markošová, K., Rebroš, M., Kotik, M., Bojarová, P., Křen, V. 2019. Bioproduction of Quercetin and Rutinose Catalyzed by Rutinosidase: Novel Concept of "Solid State Biocatalysis". *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5):1112.
21. Rai, M., Shegokar, R. 2017. *Metal Nanoparticles in Pharma*. Springer International Publishing.
22. Ridwan, RN., Gusrizal, G., Nurlina, N., Santosa, SJ. 2019. Sintesis dan Studi Stabilitas Nanopartikel Perak Tertudung Asam Salisilat. *Indonesian Journal of Pure and Applied Chemistry*, 1(3):83.
23. Kanchi, S., Ahmed, S. 2018. *Green Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Their Applications*. New Jersey: Wiley-Scrivener Publishing LLC.
24. Mogensen, KB., Kneipp, K. 2014. Size-Dependent Shifts of Plasmon Resonance in Silver Nanoparticle Films Using Controlled Dissolution: Monitoring The Onset of Surface Screening Effects. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(48):28075–28083.
25. Zhang, N., Yu, X., Hu, J., Xue, F., Ding, E. 2013. Synthesis of silver nanoparticle-coated poly-(styrene-co-sulfonic acid) hybrid materials and their application in surface-enhanced Raman scattering (SERS) tags. *RSC Adv*, (3):13740-13747.
26. Coates, R., Moran, J., Horsburgh, MJ. 2014. Staphylococci: Colonizers and Pathogens of Human Skin. *Future Microbiology*, 9(1):75–91.
27. Claudel, JP., Auffret, N., Leccia, MT., Poli, F., Corvec, S., Dréno, B. 2019. Staphylococcus epidermidis: A Potential New Player in The Physiopathology of Acne. *Dermatology*, 235(4):287-294.
28. González-Martín, M., Corbera, JA., Suárez-Bonnet, A., Tejedor-Junco, MT. 2020. Virulence Factors in Coagulase-Positive Staphylococci of Veterinary Interest other than Staphylococcus aureus. *The Veterinary Quarterly*, 40(1):118–131.
29. Dreno, B., Martin, R., Moyal, D., Henley, JB., Khammari, A., Seité, S. 2017. Skin Microbiome and Acne Vulgaris: Staphylococcus. A New Actor in Acne, *Exp Dermatol*, 26(9):798-803.
30. Fauziah, AS., Ri., Hendriani, R. 2015. Tinjauan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Cassia fistula Terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli: Artikel Review. *Farmaka*, 15(2):101–110.