

**FORMULASI SEDIAAN MIKROEMULSI MINYAK ATSIRI
DAUN JERUK SAMBAL (*Citrus microcarpa* Bunge)
DENGAN VARIASI TWEEN 20 DAN UJI
EFEKTIVITAS TERHADAP
*Propionibacterium acnes***

NASKAH PUBLIKASI



Oleh:

WAHYU ELIZA

NIM. I21111001

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK**

2015

**FORMULASI SEDIAAN MIKROEMULSI MINYAK ATSIRI DAUN
JERUK SAMBAL (*Citrus microcarpa* Bunge) DENGAN VARIASI
TWEEN 20 DAN UJI EFEKTIVITAS TERHADAP
*Propionibacterium acnes***

NASKAH PUBLIKASI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi
(S. Farm) pada Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura Pontianak**



Oleh

WAHYU ELIZA

NIM. 121111001

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK
2015**

NASKAH PUBLIKASI

FORMULASI SEDIAAN MIKROEMULSI MINYAK ATSIRI DAUN
JERUK SAMBAL (*Citrus microcarpa* Bunge) DENGAN VARIASI
TWEEN 20 DAN UJI EFEKTIVITAS TERHADAP
Propionibacterium acnes

Oleh :
WAHYU ELIZA
NIM. I21111001

Telah dipertahankan dihadapan Tim Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura Pontianak
Tanggal : 30 September 2015

Disetujui

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Rise Desnita, M.Si., Apt.
NIP. 1981 1220 2009 122 003

Rafika Sari, M.Farm., Apt.
NIP. 1984 0116 2008 012 002

Penguji I,

Penguji II,

Nera Umfia Purwanti, M.Sc., Apt.
NIP. 1981 0224 2008 122 003

Andhi Fahrurroji, M.Sc., Apt.
NIP. 1984 0819 2008 121 003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura

dr. Arif Wicaksono, M.Biomed
NIP. 1983 1030 2008 121 002

Lulus tanggal : 30 September 2015
No. SK Dekan FK : 4528/UN22.9/DT/2015
Tanggal SK : 15 Oktober 2015

**FORMULASI SEDIAAN MIKROEMULSI MINYAK ATSIRI DAUN
JERUK SAMBAL (*Citrus microcarpa* Bunge) DENGAN VARIASI
TWEEN 20 DAN UJI EFEKTIVITAS TERHADAP
*Propionibacterium acnes***

Wahyu Eliza¹, Rise Desnita¹, Rafika Sari¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

ABSTRAK

Propionibacterium acnes merupakan bakteri yang memiliki peranan penting dalam patogenesis jerawat. Minyak atsiri daun jeruk sambal (*Citrus microcarpa* Bunge) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) minyak atsiri daun jeruk sambal, konsentrasi optimal tween 20 yang digunakan untuk membuat sediaan mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal yang stabil serta membandingkan efektivitas antibakteri mikroemulsi dengan minyak atsiri dan kontrol positif. Minyak atsiri disuling menggunakan metode destilasi uap. Minyak atsiri dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 0,10%, 0,15% dan 0,20%. Minyak atsiri diformulasikan menjadi sediaan mikroemulsi dengan variasi konsentrasi tween 20 yaitu 30%(FI), 35%(FII), 40%(FIII) dan 45%(FIV). Uji stabilitas sediaan mikroemulsi meliputi organoleptis, pH sediaan, bobot jenis dan penentuan ukuran partikel. Nilai KHM minyak atsiri yang diperoleh menggunakan metode difusi cakram yaitu konsentrasi 0,1% dengan zona hambat 11,417±0,191 mm. Formula III dengan konsentrasi tween 20 sebesar 40% merupakan formula yang paling stabil dan menghasilkan zona hambat sebesar 11,875±0,323 mm. Zona hambat kontrol positif yaitu 30,625±0,835 mm. Hasil analisis uji *One-Way ANOVA* yang menggunakan program SPSS menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan antara minyak atsiri dan mikroemulsi ($p>0,05$) tetapi terdapat perbedaan signifikan minyak atsiri dan mikroemulsi terhadap kontrol positif ($p<0,05$).

Kata kunci : antibakteri, mikroemulsi, minyak atsiri daun jeruk sambal,
Propionibacterium acnes, tween 20

**MICROEMULSION FORMULATION OF ESSENTIAL OIL OF JERUK
SAMBAL LEAVES (*Citrus microcarpa* Bunge) VARIATION WITH
TWEEN 20 AND EFFECTIVENEST TEST
AGAINTS *Propionibacterium acnes***

Wahyu Eliza¹, Rise Desnita¹, Rafika Sari¹

¹*Department of Pharmacy, Medical Faculty, Tanjungpura University*

ABSTRACT

Propionibacterium acnes is a kind of bacteria that has an important role in the pathogenesis of acne. Essential oil of jeruk sambal leaves (*Citrus microcarpa* Bunge) has antibacterial activity against *Propionibacterium acnes*. The purpose of this study was to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of essential oil of jeruk sambal leaves, the optimal concentration of tween 20 used for making microemulsion of essential oil of jeruk sambal leaves was stable and to compare the effectiveness of antibacterial microemulsion with essential oils and a positive control. Essential oils distilled using steam distillation method. Essential oils were made in several concentrations of 0.10%, 0.15% and 0.20%. Essential oils were formulated into microemulsion with various concentrations of tween 20 of 30% (FI), 35% (FII), 40% (FIII) and 45% (FIV). The stability testing of microemulsion included organoleptic, dosage pH, specific gravity and particle size determination. The MIC values of essential oils tested using the disc diffusion method was by the concentration of 0.1% with inhibition zone 11.417 ± 0.191 mm. Formula III with the concentration of tween 20 of 40% was the most stable formula and produced inhibition zone of 11.875 ± 0.323 mm. Positive control inhibition zone was 30.625 ± 0.835 mm. The results of *One-Way ANOVA* analysis using SPSS showed that essential oils are not significantly different compared to the microemulsion ($p > 0.05$), but microemulsion and essential oils differed significantly compared to positive controls ($p < 0.05$).

Keywords: antibacterial, microemulsion, essential oil of jeruk sambal leaves, *Propionibacterium acnes*, tween 20

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit kulit yang sering timbul dan mengganggu para remaja adalah jerawat. *Propionibacterium acnes* merupakan salah satu bakteri yang memiliki peranan penting dalam patogenesis jerawat. Terapi yang dapat dilakukan untuk mengobati jerawat adalah obat-obat golongan antibiotik. Penggunaan obat antibiotik ini dapat menyebabkan efek samping dan bahkan terjadi resisten pada antibiotik yang sering digunakan.

Terjadinya resistensi dapat menyebabkan kegagalan dalam terapi jerawat. Oleh karena itu diperlukan pengobatan alternatif terhadap jerawat menggunakan bahan alam. Salah satu bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri adalah tanaman daun jeruk sambal (*Citrus microcarpa* Bunge). Daun jeruk sambal mengandung minyak atsiri yang berfungsi sebagai antibakteri. Senyawa yang berperan penting sebagai antibakteri pada minyak atsiri daun jeruk sambal adalah golongan terpenoid.

Berdasarkan penelitian menyatakan bahwa minyak atsiri daun jeruk sambal (*Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands) memiliki aktivitas antibakteri dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terhadap *Propionibacterium acnes* adalah 0,17% dengan diameter hambat 11 mm, namun setelah diformulasikan menjadi sediaan gel memberikan hasil yang tidak stabil pada daya sebar dan terjadi penurunan efektivitas antibakteri saat penyimpanan selama 30 hari ⁽¹⁾.

Salah satu sistem penghantaran obat (*Drug Delivery System*) yang bisa digunakan untuk mengatasi ketidakstabilan tersebut adalah mikroemulsi. Mikroemulsi adalah suatu sistem dispersi minyak dengan air yang distabilkan oleh lapisan antarmuka dari molekul surfaktan ⁽²⁾. Mikroemulsi memiliki kelebihan yaitu ukuran partikel yang sangat kecil semakin mempercepat mikroemulsi berpenetrasi ke dalam lapisan-lapisan kulit manusia sehingga dapat mengurangi abrasi ⁽³⁾.

Mikroemulsi yang akan dibuat pada penelitian ini adalah mikroemulsi dengan tipe minyak dalam air (M/A) menggunakan minyak atsiri sebagai fase minyaknya. Percobaan dilakukan dengan menggunakan variasi surfaktan tween 20 yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi surfaktan terbaik agar menghasilkan sediaan mikroemulsi yang stabil baik secara fisika maupun kimia.

Berdasarkan uraian di atas, perlu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) minyak atsiri daun jeruk sambal (*Citrus microcarpa* Bunge), konsentrasi optimal tween 20 yang digunakan untuk membuat sediaan mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal (*Citrus microcarpa* Bunge) yang stabil secara fisika dan kimia serta membandingkan efektivitas antibakteri mikroemulsi dengan minyak atsiri daun jeruk sambal dan kontrol positif terhadap *Propionibacterium acnes*.

METODOLOGI

Alat :

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah destilasi uap, autoklaf (All American Electric Sterilizer), alat gelas (Iwaki Pyrex[®]), *magnetic heater stirrer* (Schott model D-55122 Mainz), oven (memmert[®]), *Particle Size Analyzer* (PSA) (*Beckman Coulter*), sonikator, refraktometer, mikropipet (Scorex, Acura Manual Model 815.0010Y), neraca analitik (Precisa[®]), pH meter (HANNA tipe H198107), dan piknometer.

Bahan :

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jeruk sambal (*Citrus microcarpa* Bunge), tween 20 (Merck), DMDM *hyndation* (Sigma alddrich), BHT (Sigma alddrich), asam sitrat, aquades, DMSO, alkohol 70%, kultur murni *Propionibacterium acnes*, nutrien agar, media agar darah, larutan Standar Mc. Farland no. 0,5, Na₂SO₄ anhidrat, asam asetat (CH₃COOH) glasial (Merck), asam sulfat (H₂SO₄) pekat (Merck), spiritus, NaCl 0,9%, dan bahan habis pakai.

Tahapan Penelitian

Determinasi Tanaman

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jeruk sambal segar. Tanaman jeruk sambal diidentifikasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Pusat Penelitian Biologi Bogor.

Pengolahan Sampel

Daun jeruk sambal dipanen pada pagi hari. Dilakukan sortasi basah. Setelah itu, daun jeruk sambal dicuci menggunakan air mengalir⁽⁴⁾. Kemudian daun jeruk sambal ditiriskan. Tahap selanjutnya yaitu dilakukan sortasi kering dan pengubahan bentuk daun jeruk sambal dengan melakukan perajangan kasar.

Penyulingan Minyak Atsiri

Daun jeruk sambal segar dimasukkan ke dalam wadah sampel alat destilasi uap. Ditambahkan aquades ke dalam wadah aquades sampai batas dari alat destilasi. Selanjutnya didestilasi selama ±5 jam yang dihitung setelah destilat pertama turun. Destilat dipisahkan dalam labu pemisah, minyak akan memisah dari air membentuk lapisan pada permukaan. Air pada bagian bawah dipisahkan dengan membuka kran labu pemisah. Minyak diberi Na₂SO₄ anhidrat, kemudian disimpan dalam botol kaca yang kedap air dan cahaya serta disimpan dalam lemari es (suhu 4°C)^(5,6). Selanjutnya dilakukan uji mutu minyak atsiri daun jeruk sambal meliputi uji organoleptis, perhitungan bobot jenis, penetapan indeks bias dan perhitungan rendemen.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia minyak atsiri daun jeruk sambal yang dilakukan pada penelitian ini meliputi identifikasi minyak atsiri dan pemeriksaan steroid/terpenoid.

Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap minyak atsiri daun jeruk sambal dengan menggunakan 3 konsentrasi yaitu 0,10%, 0,15%, dan 0,20%. Pengujian ini dilakukan dengan metode difusi cakram. Kertas cakram diletakkan pada permukaan media *blood agar* yang telah diinokulasikan bakteri *Propionibacterium acnes*. Minyak atsiri daun jeruk sambal tersebut dipipet sebanyak 20 µL dan diletakkan di atas kertas cakram. Prosedur yang sama juga dilakukan pada kontrol negatif yaitu DMSO 15%. Petri dibiarkan pada suhu ruang selama 1 jam sebelum diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Formulasi Mikroemulsi

Setelah diperoleh Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk sambal maka konsentrasi tersebut digunakan dalam pembuatan sediaan mikroemulsi dengan menggunakan 4 variasi konsentrasi tween 20. Formula mikroemulsi dapat dilihat pada Tabel 1. Larutkan Tween 20, DMDM hydantoin dan Asam Sitrat ke dalam Aquades, dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* pada kecepatan 500 rpm selama 15 menit (fase air). Larutkan BHT ke dalam Minyak Atsiri dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* pada kecepatan 500 rpm selama 15 menit (fase minyak). Fase minyak didispersikan ke dalam fase air, dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* pada kecepatan 500 rpm selama 30 menit hingga terbentuk sediaan mikroemulsi yang jernih. Selanjutnya pengecilan ukuran mikroemulsi dilakukan dengan cara sonikasi selama 24 menit (3 siklus) menggunakan sonikator jenis bath.

Tabel 1. Formulasi Mikroemulsi

Komposisi	FMe I	FMe II	FMe II	FMe IV	Fungsi
Minyak Atsiri (%)	0,10	0,10	0,10	0,10	Zat aktif (fase minyak)
Tween 20 (%)	30	35	40	45	Surfaktan
Asam Sitrat (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	Pengatur pH
BHT (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	Antioksidan
DMDM Hydantoin (%)	0,6	0,6	0,6	0,6	Pengawet
Aquadest (mL)	ad 10,0	ad 10,0	ad 10,0	ad 10,0	Fase air

Keterangan: FMe I = Formulasi Mikroemulsi dengan Konsentrasi Tween 20 30%
FMe II = Formulasi Mikroemulsi dengan Konsentrasi Tween 20 35%
FMe III = Formulasi Mikroemulsi dengan Konsentrasi Tween 20 40%
FMe IV = Formulasi Mikroemulsi dengan Konsentrasi Tween 20 45%

Uji Stabilitas Mikroemulsi

Sediaan mikroemulsi yang sudah jadi kemudian dilakukan rangkaian uji stabilitas selama 28 hari pada suhu ruangan yaitu 27°C. Pengujian dilakukan pada hari ke 0, 1, 3, 7, 11, 21, dan 28 untuk melihat kestabilan dari mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal.

Uji Organoleptis

Pemeriksaan terhadap organoleptis yang dilakukan meliputi warna, aroma, kejernihan dan pemisahan fase mikroemulsi yang diamati secara visual.

Pengukuran pH

Pengukuran pH sediaan mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal dilakukan menggunakan alat pH meter.

Penetapan Bobot Jenis

Penentuan bobot jenis mikroemulsi dilakukan dengan menggunakan alat Piknometer.

Penentuan Ukuran Partikel Mikroemulsi

Pengukuran ukuran partikel mikroemulsi diukur menggunakan *Particle Size Analyzer (PSA) Beckman Coulter*.

Uji Aktivitas Antibakteri Mikroemulsi

Setelah mendapatkan formulasi mikroemulsi yang stabil, dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*. Uji aktivitas antibakteri mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal dilakukan dengan cara difusi. Kertas cakram diletakkan pada permukaan media *blood agar* pada petri yang telah diinokulasikan bakteri *Propionibacterium acnes*. Mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal tersebut dipipet sebanyak 20 µL dan diletakkan di atas kertas cakram. Prosedur yang sama juga dilakukan pada kontrol positif yaitu obat Medi-Klin. Petri dibiarkan pada suhu ruang selama 1 jam sebelum diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan mengukur diameter zona hambat.

Analisis Data

Data yang didapat berupa data kuantitatif yaitu diameter zona hambat minyak atsiri daun jeruk sambal, diameter zona hambat kontrol positif, dan diameter zona hambat mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal. Analisis data dilakukan dengan uji *One-Way ANOVA* menggunakan program SPSS untuk melihat nilai signifikansi perbandingan daya hambat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman

Berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) membuktikan bahwa tanaman yang digunakan adalah tanaman jeruk sambal dengan spesies *Citrus microcarpa* Bunge.

Pengolahan Sampel

Bagian tanaman jeruk sambal yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian daun. Daun jeruk sambal ini diperoleh di daerah Desa Kalimas Tengah Jl.Raya Sungai Kakap. Pengambilan sampel daun jeruk sambal dilakukan pada pagi hari bertujuan agar kadar metabolit sekunder pada tanaman jeruk sambal mencapai kadar yang maksimal.

Daun jeruk sambal yang diperoleh selanjutnya dilakukan proses sortasi basah yang bertujuan untuk memisahkan antara bagian daun yang akan digunakan dari batang, bunga, buah, dan bagian daun yang rusak. Selanjutnya dilakukan proses pencucian daun jeruk sambal dengan menggunakan air yang mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan debu yang melekat pada daun jeruk sambal. Daun jeruk sambal yang telah dicuci kemudian ditiriskan yang bertujuan untuk menguapkan sisa air dari proses pencucian. Tahapan terakhir adalah sortasi kering dan dilakukan perajangan kasar.

Penyulingan Minyak Atsiri

Metode penyulingan yang digunakan pada penelitian ini yaitu menggunakan metode destilasi uap. Metode destilasi uap dipilih karena memiliki beberapa keuntungan antara lain menghasilkan rendemen serta mutu minyak atsiri paling baik. Selain itu, proses hidrolisis yang terjadi relatif kecil karena tidak langsung kontak dengan air⁽⁷⁾. Langkah kerja dari destilasi uap adalah sampel segar daun jeruk sambal sebanyak 2 kg dimasukkan ke dalam wadah sampel. Kemudian wadah aquades diisi dengan aquades sampai tanda batas pada alat. Selanjutnya didestilasi selama ± 5 jam pada suhu 98°C . Waktu destilasi dihitung mulai dari destilat menetes pertama kali. Minyak atsiri akan terpisah dengan sendirinya dari air karena adanya perbedaan berat jenis dimana berat jenis minyak atsiri lebih kecil daripada air sehingga minyak atsiri terletak di lapisan paling atas.

Selanjutnya ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat. Penambahan Na_2SO_4 anhidrat berfungsi untuk menghilangkan air yang masih tersisa pada minyak atsiri. Didapatkan hasil yaitu terbentuknya endapan putih yang menandakan adanya ikatan antara Na_2SO_4 anhidrat dan air. Hal ini dikarenakan Na_2SO_4 anhidrat bersifat higroskopis sehingga dapat mengikat molekul air yang masih tersisa pada minyak atsiri. Minyak atsiri yang diperoleh sebanyak 25,9 mL berupa cairan bewarna bening kekuning-kuningan dan memiliki aroma yang segar serta aroma khas dari daun jeruk sambal. Bobot jenis minyak atsiri daun jeruk sambal yang dihasilkan sebesar 0,8786 g/mL. Indeks bias yang didapat dari minyak atsiri daun jeruk sambal adalah 1,49. Rendemen minyak atsiri daun jeruk sambal yang diperoleh sebesar 0,1896%.

Skrining Fitokimia

Tujuan dilakukannya skrining fitokimia adalah untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman jeruk sambal yang berperan

sebagai antibakteri. Hasil skrining fitokimia pada sampel daun jeruk sambal menunjukkan bahwa positif mengandung minyak atsiri dan senyawa terpenoid. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia

No.	Pemeriksaan	Reagen	Hasil
1.	Minyak Atsiri	-	+
2.	Steroid	CH ₃ COOH glasial, H ₂ SO ₄ pekat	-
3.	Terpenoid	CH ₃ COOH glasial, H ₂ SO ₄ pekat	+

Keterangan: (+) positif : mengandung golongan senyawa; (-) negatif: tidak mengandung

Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap minyak atsiri daun jeruk sambal dilakukan dengan metode *disc diffusion* Kirby-Bauer. Minyak atsiri daun jeruk sambal dibuat dalam 3 seri konsentrasi yaitu 0,10%, 0,15% dan 0,20%. Kontrol negatif yang digunakan yaitu dimetil sulfoksida (DMSO) karena DMSO merupakan pelarut yang digunakan untuk melarutkan minyak atsiri daun jeruk sambal dalam pembuatan seri konsentrasi. Larutan DMSO yang digunakan yaitu konsentrasi 15% .

Hasil uji aktivitas antibakteri dari DMSO 15% tidak menunjukkan adanya zona hambat. Hal ini membuktikan bahwa DMSO 15% tidak memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Minyak atsiri daun jeruk sambal memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Hal ini dibuktikan dengan adanya zona hambat. Daya antibakteri ketiga konsentrasi minyak atsiri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* adalah kuat, sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa penggunaan minyak atsiri daun jeruk sambal dengan konsentrasi 0,1% dapat digunakan sebagai Konsentasi Hambat Minimum (KHM) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari minyak atsiri daun jeruk sambal terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 3.

Formulasi Mikroemulsi

Dilakukan formulasi sediaan mikroemulsi minyak dalam air (m/a) menggunakan minyak atsiri sebagai fase minyak. Tujuan pembuatan mikroemulsi minyak dalam air (m/a) adalah untuk melindungi minyak atsiri dari penguapan sehingga tidak mengurangi aktivitas antibakteri yang dihasilkan.

Formulasi mikroemulsi yang dibuat pada penelitian ini sebanyak 4 formula dengan variasi konsentrasi tween 20 yaitu 30%, 35%, 40%, dan 45%. Proses pembuatan mikroemulsi yaitu dilarutkan tween 20, DMDM hyndatoin dan asam sitrat ke dalam aquades, kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirer* pada kecepatan 500 rpm selama 15 menit (fase air). Dilarutkan BHT ke dalam

minyak atsiri (fase minyak). Setelah itu fase minyak didispersikan ke dalam fase air sedikit demi sedikit, dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* pada kecepatan 500 rpm sampai terbentuk sediaan mikroemulsi yang jernih. Waktu pengadukan yang diperlukan untuk menghasilkan sediaan mikroemulsi yang jernih yaitu selama 30 menit. Langkah selanjutnya yaitu sediaan mikroemulsi yang sudah jernih disonikasi menggunakan sonikator tipe bath selama 24 menit (3 siklus). Tujuan dilakukan sonikasi adalah untuk memperkecil ukuran partikel.

Tabel 3. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri (±SD, n=3)

Bakteri Uji	Konsentrasi (%)	Zona Hambat (mm)			Rata-rata (mm)
		Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
<i>Propionibacterium acnes</i>	0,10	11,625	11,375	11,250	11,417±0,191
	0,15	11,375	10,125	11,625	11,042±0,804
	0,20	11,750	15,125	13,500	13,458±1,688
	DMSO 15%	-	-	-	-

Ket : - = tidak terdapat zona hambat



Gambar 1. Uji Aktivitas Minyak Atsiri Terhadap Bakteri Propionibacterium acnes

Uji Stabilitas Mikroemulsi

Uji Organoleptis

Uji organoleptis yang dilakukan meliputi warna, aroma, kejernihan dan pemisahan fase mikroemulsi. Didapatkan warna mikroemulsi yaitu bening kekuningan dan memiliki aroma khas dari minyak atsiri daun jeruk sambal. Hasil pengamatan terhadap kejernihan mikroemulsi menunjukkan bahwa mikroemulsi yang dibuat mempunyai sifat fisik yang baik yaitu jernih. Pengamatan terhadap

pemisahan fase yaitu tidak terjadi pemisahan fase selama 28 hari penyimpanan kecuali pada formula I dan formula II. Formula I dan Formula II mengalami ketidakstabilan mikroemulsi yaitu terjadi pemisahan fase pada hari ke-28. Ketidakstabilan mikroemulsi pada Formula I dan Formula II merupakan *creaming* yaitu terpisahnya emulsi menjadi dua lapisan, dimana satu bagian mengandung fase disper lebih banyak daripada lapisan yang lain. *creaming* bersifat reversibel, artinya jika dikocok perlahan-lahan akan terdispersi kembali.

Pengukuran pH

Pengukuran pH sediaan mikroemulsi dilakukan dengan menggunakan pH meter. Tujuan dilakukannya pengukuran pH adalah untuk melihat kestabilan pH sediaan mikroemulsi selama masa penyimpanan 28 hari. Adapun syarat pH kulit yaitu 4,5-6,5. Hasil pengukuran pH sediaan mikroemulsi menunjukkan bahwa pH sediaan mikroemulsi relatif stabil karena tidak terjadi perubahan pH secara bermakna selama 28 hari penyimpanan. Diperoleh pH sediaan mikroemulsi yang dibuat berada pada rentang 5,4-5,6. Hal ini menunjukkan bahwa sediaan mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal memiliki pH yang baik karena masuk dalam rentang pH kulit. Hasil pengukuran pH dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pengukuran pH selama 28 hari (±SD, n=3)

Pengukuran pH Hari Ke-	Formula I	Formula II	Formula III	Formula IV
0	5,43±0,057	5,47±0,057	5,50±0,000	5,60±0,000
1	5,40±0,000	5,40±0,100	5,50±0,100	5,63±0,057
3	5,43±0,057	5,47±0,057	5,50±0,000	5,60±0,100
7	5,43±0,057	5,43±0,057	5,50±0,000	5,60±0,100
11	5,40±0,000	5,47±0,057	5,50±0,000	5,60±0,000
21	5,40±0,000	5,47±0,057	5,50±0,000	5,60±0,000
28	5,40±0,000	5,40±0,000	5,50±0,000	5,60±0,100

Penentuan Bobot Jenis

Penetapan bobot jenis dilakukan menggunakan piknometer. Hasil bobot jenis mikroemulsi Formula I, Formula II, Formula III dan Formula IV menunjukkan bahwa tidak terjadi perbedaan bobot jenis yang bermakna selama penyimpanan 28 hari. Hal ini membuktikan bahwa bobot jenis pada semua formula relatif stabil. Nilai bobot jenis dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengukuran Bobot Jenis (±SD, n=3)

Pengukuran Bobot Jenis Hari Ke-	Formula I	Formula II	Formula III	Formula IV
0	1,0432±0,0004	1,0489±0,0002	1,0575±0,0002	1,0656±0,0003
1	1,0440±0,0003	1,0503±0,0002	1,0588±0,0002	1,0666±0,0004
3	1,0440±0,0002	1,0514±0,0003	1,0594±0,0004	1,0676±0,0002
7	1,0441±0,0002	1,0514±0,0002	1,0596±0,0001	1,0676±0,0003
11	1,0441±0,0002	1,0516±0,0002	1,0595±0,0004	1,0674±0,0002
21	1,0452±0,0004	1,0524±0,0004	1,0595±0,0001	1,0686±0,0004
28	1,0450±0,0002	1,0523±0,0003	1,0594±0,0004	1,0684±0,0003

Pengukuran Ukuran Partikel Mikroemulsi

Sediaan mikroemulsi yang diukur ukuran partikelnya adalah formula yang paling stabil. Terdapat dua formula mikroemulsi yang stabil yaitu Formula III dan Formula IV. Formula yang dipilih dan diukur ukuran partikelnya adalah Formula III dengan konsentrasi tween 20 sebesar 40% karena konsentrasi tween 20 yang digunakan pada Formula III lebih kecil untuk menghasilkan mikroemulsi yang jernih daripada Formula IV. Hasil PSA yang dilakukan pada sediaan mikroemulsi Formula III menunjukkan bahwa terdapat rata-rata diameter globul yaitu 12,2 nm dengan standar deviasi yaitu 2,5. Nilai Indeks Polidispers (IP) yang didapat yaitu 0,565.

Uji Aktivitas Antibakteri Mikroemulsi

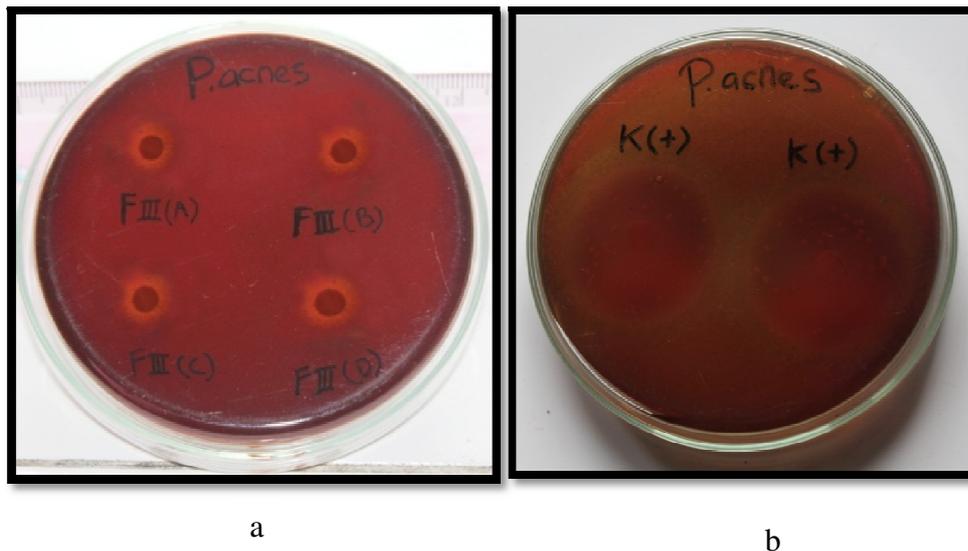
Uji aktivitas sediaan mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal dilakukan untuk mengetahui efektivitas minyak atsiri daun jeruk sambal setelah diformulasikan dalam sediaan mikroemulsi. Sediaan mikroemulsi yang akan diuji aktivitasnya terhadap *Propionibacterium acnes* adalah Formula III dengan konsentrasi tween 20 sebesar 40% karena formula ini yang paling stabil selama penyimpanan 28 hari. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah Medi-klin yang mengandung zat aktif yaitu klindamisin. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari sediaan mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal dan kontrol positif terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Zona Hambat Aktivitas Antibakteri Mikroemulsi (\pm SD, n=4)

Formula	Zona Hambat (mm)				Rata-Rata (mm)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Ulangan IV	
F III (Mikroemulsi)	11,500	11,750	12,000	12,250	11,875 \pm 0,323
Kontrol Positif (Medi-klin)	29,500	30,500	31,125	31,375	30,625 \pm 0,835

Hasil pengujian efektivitas sediaan mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal memberikan aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dengan zona hambat rata-rata sebesar 11,875 mm. Kontrol positif yaitu Medi-klin juga memberikan aktivitas antibakteri terhadap *P.acnes* yang lebih besar dibandingkan sediaan mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal yaitu rata-rata sebesar 30,625 mm. Senyawa yang berperan sebagai antibakteri adalah senyawa golongan terpenoid. Aktivitas antibakteri terpenoid diduga melibatkan pemecahan membran oleh komponen-komponen lipofilik. Selain itu, senyawa terpenoid memiliki target utama yaitu membran sitoplasma yang mengacu pada sifat

alamnya yang hidrofobik⁽⁸⁾. Hasil pengujian aktivitas antibakteri mikroemulsi dan kontrol positif dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Uji Antibakteri dari Sediaan Mikroemulsi Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal (a) dan Kontrol Positif (b) terhadap *Propionibacterium acnes*

Dilakukan analisis data menggunakan program SPSS 18.0. Analisis efektivitas antibakteri dilakukan untuk melihat perbedaan efektivitas minyak atsiri daun jeruk sambal, minyak atsiri daun jeruk sambal yang telah diformulasikan menjadi sediaan mikroemulsi dan kontrol positif (Medi-klin). Data yang dianalisis terdistribusi normal dan homogen. Hasil analisis menunjukkan bahwa efektivitas antibakteri antara minyak atsiri daun jeruk sambal dengan minyak atsiri daun jeruk sambal yang diformulasikan menjadi sediaan mikroemulsi tidak terjadi perbedaan signifikan ($p > 0,05$), sedangkan efektivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk sambal dan minyak atsiri daun jeruk sambal yang telah diformulasikan menjadi sediaan mikroemulsi dibandingkan dengan kontrol positif (Medi-klin) memperlihatkan hasil yaitu terjadi perbedaan signifikan dalam zona hambat yang dihasilkan dilihat dari nilai $p < 0,05$. Berdasarkan data analisis tersebut dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri daun jeruk sambal masih memberikan efek antibakteri yang sama besar terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* ketika minyak atsiri daun jeruk sambal tersebut diformulasikan dalam bentuk sediaan mikroemulsi, artinya sediaan mikroemulsi ini dapat melindungi minyak atsiri daun jeruk sambal dari penguapan sehingga tidak mengurangi efektivitas antibakteri yang dihasilkan setelah diformulasikan dalam bentuk sediaan mikroemulsi. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Analisis *Independent Sample T-Test* Efektivitas Antibakteri

Pasangan Kelompok	Nilai Signifikansi	Keterangan
Minyak Atsiri-Mikroemulsi	P>0,05	Tidak berbeda signifikan
Minyak Atsiri- Kontrol Positif	P<0,05	Berbeda signifikan
Mikroemulsi-Kontrol Positif	P<0,05	Berbeda signifikan

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) minyak atsiri daun jeruk sambal (*Citrus microcarpa* Bunge) terhadap *Propionibacterium acnes* adalah konsentrasi 0,1%. Konsentrasi tween 20 yang digunakan untuk membuat mikroemulsi yang stabil yaitu sebesar 40%. Sediaan mikroemulsi minyak atsiri daun jeruk sambal memiliki efek antibakteri yang sama besar dibandingkan dengan minyak atsiri daun jeruk sambal terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan zona hambat masing-masing sebesar 11,875±0,323 mm dan 11,417±0,191 mm tetapi efektivitas antibakteri mikroemulsi dan minyak atsiri daun jeruk sambal lebih kecil jika dibandingkan dengan kontrol positif dengan zona hambat sebesar 30,625±0,835 mm.

Daftar Pustaka

1. Roudhatini. Uji Efektivitas Sediaan Gel Anti Jerawat Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal (*Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands) Terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*. Pontianak: Universitas Tanjungpura. *Skripsi*. 2013.
2. Zheng, Min-Ying, Feng Liu, Zheng-Wu Wang, dan Jin-Hua Baoyindugurong. Formation and Characterization of Self-Assembling Fish Oil Microemulsion Colloid. *Journal*. 2011.
3. Schoenwald RD dan DR Flanagan. Bioavailability of Disperse Dosage Forms. Marcel Dekker Inc. New York. 1989; (2): 115-117.
4. Gunawan D., Mulyani, Sri. Ilmu Obat Alam (Farmakognosi). Jilid I. Yogyakarta: Penebar Swadaya. 2004; 107.
5. Apriyantono A. Ekstraksi dan Karakterisasi Minyak Kulit Jeruk Pontianak (*Citrus nobilis var microcarpa*). *Jurnal Teknik dan Industri Pangan*. 1996; 7 (2); 10-15.
6. Nareswari N. Pembuatan Salep Minyak Atsiri Daun Jeruk Limau (*Citrus amblycarpa* (Hassk) ochse) Terhadap Tipe Basis yang Digunakan. *Karya Ilmiah*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret. 2011.
7. Guanter E. Minyak Atsiri. Jilid 1. Diterjemahkan oleh Ketaren RS dan mulyono. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia; 1987.
8. Mercy N dkk. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In vitro*. Manado : Jurusan Kimia FMIPA; 2Zheng, Min-Ying, Feng Liu, Zheng-Wu Wang, dan Jin-Hua Baoyindugurong. Formation and Characterization of Self-Assembling Fish Oil Microemulsion Colloid. *Journal*. 2011.