

NASKAH PUBLIKASI

**UJI EFEKTIVITAS SEDIAAN GEL ANTI JERAWAT MINYAK ATSIRI
DAUN JERUK SAMBAL (*X Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands)
TERHADAP *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis***



Oleh

ROUDHATINI

NIM. I 211 09 013

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK
2013**

NASKAH PUBLIKASI

**UJI EFEKTIVITAS SEDIAAN GEL ANTI JERAWAT MINYAK ATSIRI
DAUN JERUK SAMBAL (*X Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands)
TERHADAP *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis***

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



Oleh

ROUDHATINI

NIM. I 211 09 013

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK
2013**

**UJI EFEKTIVITAS SEDIAAN GEL ANTI JERAWAT MINYAK ATSIRI
DAUN JERUK SAMBAL (*X Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands)
TERHADAP *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis***

ABSTRAK

Jerawat terjadi karena penyumbatan pada pilosebaceus dan peradangan yang umumnya dipicu oleh *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*. Sudah terdapat produk-produk kosmetik yang dihasilkan untuk menangani masalah jerawat, namun obat-obat ini memiliki efek samping dalam penggunaannya. Salah satu bahan dari alam yang dapat dimanfaatkan sebagai alternatif pengobatan jerawat adalah minyak atsiri daun jeruk sambal (*X Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan memformulasi minyak atsiri daun jeruk sambal dalam sediaan gel dan diuji efektivitas mikrobiologi, stabilitas fisik dan kimianya serta dianalisis dengan Uji R. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental, dimana dibuat tiga formula gel dengan variasi basis HPMC 4000:Carbopol 934, yaitu F₁ (70:30), F₂ (50:50) dan F₃ (30:70). Hasil evaluasi mikrobiologi menggunakan metode difusi menunjukkan bahwa F₂ memberikan efektivitas paling baik. Efektivitas antibakteri seluruh gel menurun setelah 30 hari penyimpanan. Efektivitas gel minyak atsiri daun jeruk sambal lebih besar terhadap *P.acnes* dan lebih kecil terhadap *S.epidermidis* dibandingkan dengan kontrol positif. Hasil evaluasi stabilitas fisika dan kimia menunjukkan bahwa gel tetap stabil, sedangkan daya sebar meningkat selama penyimpanan. Uji analisis *One Way Anova* menunjukkan bahwa daya sebar setiap formula gel berbeda signifikan.

Kata Kunci : Jerawat, Jeruk Sambal, Carbopol, HPMC, Uji Stabilitas

**EFFECTIVENESS TEST OF ANTI ACNE GEL FROM JERUK SAMBAL
(*X Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands) LEAF ESSENTIAL OIL
AGAINST *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis***

ABSTRACT

Acne is caused by blockage of the pilosebaceous and the inflammation triggered by *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. Many cosmetic products have been produced to help against acnes, however this products have negative sides effect in its use. One natural ingredients that can be used as an alternative against acnes is the essential oil of Jeruk Sambal (*X Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands). Therefore, this research tried to formulated essential oil of Jeruk Sambal in form of gel and then tested their microbiology effectiveness as well as their physical and chemical stability and analyzing them using R test. This research was using experimental method of three formulas with Carbopol 934:HPMC 4000 variation basis; namely F₁ (70:30), F₂ (50:50) and F₃ (30:70). The result of microbiology by diffusion method showed F₂ as the most effectiveness among the three. Whole gels antibacterial effectiveness were decreased after 30 days of storage. Gels are proved to be more effective to *P.acnes* than *S.epidermidis* by using positive control. The physical and chemical test reaction showed the gels remain stable, whereas the spreadability was increase during storage. One Way Anova test analysis showed that the spreadability whole gels significantly different.

Keywords : Acne, Jeruk Sambal, Carbopol, HPMC, Stability Test

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit kulit yang sering mendapat perhatian bagi para remaja dan dewasa muda adalah jerawat. Jerawat merupakan penyakit peradangan yang terjadi akibat penyumbatan pada pilosebacea yang ditandai dengan adanya komedo, papul, pastul dan bopeng (*scar*) pada daerah wajah, leher, lengan atas, dada dan punggung. Peradangan dipicu oleh bakteri *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus aureus*⁽¹⁾.

Sudah terdapat produk-produk kosmetik yang dihasilkan untuk menangani masalah jerawat, misalnya antibiotik benzoil peroksida, asam azelat dan retinoid⁽²⁾. Namun, obat-obat ini memiliki efek samping dalam penggunaannya sebagai anti jerawat antara lain resistensi antibiotik, iritasi, kerusakan organ dan terjadinya imunohipersensitivitas⁽¹⁾. Hal inilah yang melatarbelakangi penelitian ini untuk mencari alternatif pengobatan yang berasal dari bahan alam yang memiliki efek samping minimal. Salah satu tanaman yang secara empiris dan berdasarkan data ilmiah memiliki khasiat anti jerawat adalah daun jeruk sambal (*X Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands). Komponen penyusun minyak daun jeruk sambal yang dapat diidentifikasi adalah senyawa aldehida, seskuiterpena, linalool dan linalil asetat⁽³⁾. Selain itu minyak atsiri daun jeruk sambal juga mengandung tanin, glikosida dan senyawa sianogenik. Hal ini diperkuat dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Yulliasri Jamal *et al*⁽⁴⁾ bahwa daun jeruk sambal memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus aureus* yang lebih efektif dibandingkan dengan kulit buahnya. Daun jeruk sambal efektif terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus epidermidis* dan

Staphylococcus aureus, diduga minyak atsiri daun jeruk sambal juga memiliki efektivitas terhadap bakteri penyebab jerawat lainnya, yakni *Propionibacterium acnes*. Minyak atsiri ini dapat diformulasi dalam bentuk sediaan gel untuk mempermudah penggunaannya. Sediaan dalam bentuk gel lebih banyak digunakan karena mudah mengering, membentuk lapisan film yang mudah dicuci dan memberikan rasa dingin di kulit. Sediaan gel mempunyai kadar air yang tinggi, sehingga dapat menghidrasi *stratum corneum* dan mengurangi resiko timbulnya peradangan lebih lanjut akibat akumulasi minyak pada pori-pori sehingga cocok digunakan sebagai sediaan dalam formulasi obat anti jerawat⁽⁵⁾. Formulasi minyak atsiri daun jeruk sambal pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 3 variasi komposisi basis HPMC 4000 dan Carbopol 934 dengan tujuan untuk mengetahui efektivitas minyak atsiri setelah diformulasi dan memperoleh formulasi gel minyak atsiri daun jeruk sambal yang memberikan efektivitas paling baik dibandingkan dengan kontrol positif dengan dilakukan pengujian stabilitas mikrobiologi terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*, serta pengujian stabilitas fisika dan kimia.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk sambal segar sebanyak 8 kg, *verile[®] acne gel* (gel anti jerawat pembanding), media *Nutrient Agar*, media *Agar Darah (Blood Agar)*, standar Mc. Farland no. 0,5, kertas saring Whatman no. 1, aluminium foil, kapas, kasa steril, plastik tahan panas, kertas sampul coklat, akuadest steril, spiritus, minyak kelapa, alkohol 70%, Kloroform teknis, pereaksi Mayer, pereaksi Molish, serbuk magnesium (Mg), asam klorida

(HCL) pekat, pereaksi besi (III) klorida (FeCl_3) 5 %, asam sulfat (H_2SO_4) pekat, asam asetat glasial (CH_3COOH), natrium sulfat (Na_2SO_4) anhidrat, natrium klorida (NaCl), HPMC 4000, Carbopol 934, Trietanolamin (TEA), Propilenglikol dan Metil paraben.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain pisau, alat destilasi uap-air, *laminar airflow cabinet* (HL 36Ae[®]), oven (memmert[®]), autoklaf (HL 36Ae), lemari pendingin (LG), timbangan analitik (Ohaus PA2102), *sentrifuge* (Tenaco[®]), pH meter (Soil Tester SDT-60 SDT-300), jarum Ose, pembakar Bunsen, jangka sorong, vial, sendok tanduk, sendok *stainless*, batang pengaduk (Iwaki Pyrex[®]), corong kaca (Iwaki Pyrex[®]), pinset, labu ukur 10 mL dan 25 mL (Iwaki Pyrex[®]), gelas ukur 10 mL dan 100 mL (Iwaki Pyrex[®]), Erlenmeyer (Iwaki Pyrex[®]), *Beaker glass* (Iwaki Pyrex[®]), tabung reaksi (Iwaki Pyrex[®]), pipet tetes, pipet *volume*, cawan petri, piknometer 10 mL, kaca arloji, *stopwatch*, *object glass*, tip dan mikropipet (Rainin E1019705K), mortar, stamper dan *bulb*.

Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur bakteri *Propionibacterium acnes* yang merupakan koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan kultur bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang merupakan koleksi dari Unit Laboratorium Kesehatan (ULK) Pontianak.

METODE

Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Daun jeruk sambal dipanen pada pagi hari, daun yang dipilih adalah daun yang masih muda. Daun kemudian dicuci dengan air mengalir, selanjutnya dipotong menjadi kecil-kecil menggunakan pisau, ditimbang untuk selanjutnya dilakukan proses destilasi.

Penyulingan Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal

Daun jeruk sambal segar sebanyak \pm 8 kg dimasukkan ke dalam dandang alat destilasi uap air seluruhnya. Ditambahkan *aquadest* ke dalam tempat sampel destilasi sampai batas dari alat. Selanjutnya didestilasi kurang lebih selama 5 jam. 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 *disentrifuge* dan ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat, kemudian ditampung dalam botol yang kedap air dan cahaya dan disimpan dalam lemari es (suhu 4°C). Selanjutnya dilakukan perhitungan bobot jenis dan rendemen minyak atsiri daun jeruk sambal.

Skrining Fitokimia

Identifikasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah identifikasi minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, glikosida, steroid dan triterpenoid.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dengan cara menutup alat-alat yang telah disterilkan dengan aluminium foil dan kapas. Alat-alat non gelas disterilkan dengan autoklaf dan diatur pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inch*) selama 15 menit. Alat-alat gelas disterilkan di oven suhu 160-170°C selama 2 jam. Jarum ose dibakar dengan api Bunsen sampai merah⁽⁶⁾.

Pembuatan Media untuk Bakteri Uji

1. Nutrient Agar

Sebanyak 23 g *nutrient agar* dilarutkan dalam 1000 mL akuadest steril kemudian dipanaskan, dilanjutkan pengecekan pH media berkisar $6,8 \pm 0,2$. Media kemudian disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit⁽⁷⁾.

2. Blood Agar

Sebanyak 40 gram *Tryptic Soy Agar* (TSA) dilarutkan ke dalam 1000 mL akuadest steril, kemudian pH media diukur sampai 7,3 dan dipanaskan

selanjutnya disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Hangatkan darah kambing segar sebanyak 50 mL sampai suhu hingga 50°C. TSA steril didinginkan sampai suhu mencapai 50°C kemudian darah kambing segar dituangkan ke dalam labu berisi TSA⁽⁸⁾.

Persiapan dan Uji Aktivitas Antibakteri

Persiapan uji aktivitas antibakteri meliputi pembuatan seri konsentrasi dan persiapan kontrol negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah etanol 96%. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan media agar darah untuk *Propionibacterium acnes* dan *Nutrient Agar* untuk *Staphylococcus epidermidis*. Pada media yang telah memadat biakan bakteri ditanam menggunakan jarum ose dengan menggoreskannya ke media. Kemudian diletakkan cakram kertas dengan diameter 6 mm, diteteskan 20 µL larutan uji minyak atsiri daun jeruk sambal dengan berbagai konsentrasi dan kontrol negatif pada cakram kertas. Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 35 ± 2°C selama 24 – 48 jam, setelah itu diukur diameter daerah hambatan (zona jernih) pertumbuhan di sekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong⁽⁸⁾⁽⁹⁾.

Formulasi Gel

Dosis yang digunakan pada pembuatan gel adalah menggunakan konsentrasi minyak atsiri daun jeruk sambal terbesar diantara kedua bakteri uji yang memberikan diameter hambatan kurang lebih sebesar 14-16 mm, yakni pada konsentrasi 1%. Pada penelitian ini akan dibuat gel minyak atsiri daun jeruk sambal dengan memvariasikan basis HPMC dan Carbopol dengan perbandingan 70:30 (F₁), 50:50 (F₂) dan 30:70 (F₃). Kelompok kontrol negatif merupakan gel tanpa minyak atsiri yang dibuat sebagai gel kontrol pada uji efektivitas mikrobiologi. Berikut tabel komposisi bahan dalam sediaan gel:

Tabel 1. Komposisi Bahan dalam Sediaan Gel

Bahan	Jumlah Bahan (gram)		
	F ₁	F ₂	F ₃
Minyak Atsiri	1	1	1
HPMC 4000	2,45	1,75	1,05
Carbopol 934	1,05	1,75	2,45
Propilenglikol	15	15	15
Metil paraben	0,18	0,18	0,18
TEA	1,05	1,75	2,45
Akuadest sampai	100	100	100

Cara pembuatan gel: HPMC dikembangkan ke dalam air panas sebanyak 20 kali beratnya selama 15 menit. Setelah mengembang digerus sampai transparan. Carbopol pada lumpang yang berbeda dikembangkan dengan air panas hingga homogen, kemudian ditambahkan trietanolamin (TEA) hingga jernih. HPMC yang telah dikembangkan dimasukkan ke dalam lumpang yang berisi carbopol dan digerus hingga homogen. Metil paraben yang telah dilarutkan dalam propilenglikol dicampurkan ke dalam basis dan digerus hingga homogen. Akuadest ditambahkan sedikit demi sedikit dan digerus homogen hingga diperoleh dasar gel. Minyak atsiri ditambahkan terakhir ke dalam dasar gel dan digerus hingga homogen⁽¹⁰⁾.

Uji Stabilitas Sediaan Gel

Uji stabilitas sediaan gel meliputi stabilitas mikrobiologi yang dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-29, fisika dan kimia pada hari ke 0, 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 dan 29 pada suhu kamar. Uji stabilitas mikrobiologi meliputi penentuan efektivitas antibakteri sediaan gel minyak atsiri daun jeruk sambal terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis* dengan metode difusi agar. Uji stabilitas fisika meliputi pemeriksaan organoleptik, uji daya lekat dan uji daya sebar. Uji stabilitas kimia meliputi penentuan pH.

1. Uji Mikrobiologi Sediaan

Pada media yang telah memadat biakan bakteri ditanam menggunakan jarum ose dengan menggoreskannya ke media. Kemudian diletakkan cakram kertas dengan diameter 6 mm, Ditimbang sebanyak 0,1 g gel minyak atsiri daun jeruk sambal dan kontrol positif *verile[®] acne gel* kemudian diteteskan dengan 1 tetes akuadest steril dan diletakkan diatas cakram kertas. Diinkubasi dalam inkubator pada suhu $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 – 48 jam, setelah itu diukur diameter daerah hambatan (zona jernih) pertumbuhan di sekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong⁽⁸⁾⁽⁹⁾.

2. Pemeriksaan Organoleptik dan Homogenitas

Pemeriksaan organoleptik meliputi pemeriksaan bentuk, warna dan bau yang diamati secara visual. Sediaan dinyatakan stabil apabila warna, bau dan penampilan tidak berubah secara visual selama penyimpanan dan juga tidak ditumbuhi jamur. Selain itu, juga dilakukan pengujian homogenitas sediaan dengan cara mengoleskan sediaan pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang cocok, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butir-butir yang kasar. Prosedur uji dilakukan triplo⁽¹¹⁾.

3. Penentuan pH Sediaan

Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter *soil tester*. Alat pH meter dicelupkan secara langsung ke dalam sediaan gel. Kemudian dilihat perubahan skala pada pH meter. Angka yang tertera pada skala pH meter merupakan nilai pH dari sediaan. Prosedur uji dilakukan triplo.

4. Uji Daya Sebar

Penentuan daya sebar gel dilakukan dengan Ekstensometer. Sampel gel sebanyak 1 g diletakkan di pusat antara dua kaca arloji, dimana kaca arloji sebelah atas dibebani dengan meletakkan anak timbangan sehingga

mencapai bobot 150 g. Pengukuran dilakukan hingga diameter penyebaran gel konstan. Prosedur uji dilakukan triplo⁽¹²⁾.

5. Uji Daya Lekat

Ditimbang 0,25 gram gel dan diletakkan diatas gelas objek yang telah diketahui luasnya. Diletakkan gelas objek yang lain diatas gel tersebut. Kemudian ditekan dengan beban 1000 gram selama 5 menit. Kemudian dilepaskan beban seberat 50 gram dan dicatat waktunya hingga kedua gelas objek ini terlepas. Prosedur uji dilakukan triplo⁽¹³⁾.

Analisis Data

Data yang didapat berupa efektivitas antibakteri sediaan dengan variasi komposisi basis dan hasil uji stabilitas sediaan. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program *R-Commander* seri 2.14.1. Pengujian yang dilakukan adalah uji *T-Independent* untuk mengetahui nilai signifikansi efektivitas gel berbanding kontrol positif pada hari uji ke-0 dan daya sebar antar formula gel. Serta uji *One Way ANOVA (Analysis of Varians)* untuk membandingkan nilai signifikansi daya sebar F_1 , F_2 dan F_3 .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun jeruk sambal diperoleh dari kebun jeruk sambal yang terletak di daerah Wajok Hilir, Pontianak, Kalimantan Barat. Daun jeruk sambal dipanen pada pagi hari, pada saat matahari belum tinggi hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya penguapan minyak atsiri pada daun karena sifatnya yang volatil. Selain itu, bagian daun yang dipilih adalah daun yang masih muda yakni yang berwarna hijau muda dan berada di pucuk daun, karena umumnya pada saat inilah terjadi penumpukan senyawa aktif dalam kondisi tinggi sehingga mempunyai mutu yang terbaik. Teknik pemanenan daun jeruk sambal dilakukan dengan pemetikan daun satu persatu dengan menggunakan tangan hal ini dilakukan

untuk menghindari terjadinya kerusakan senyawa aktif yang terkandung pada sampel apabila pemanenan dilakukan menggunakan bahan yang terbuat dari logam. Selanjutnya dilakukan sortasi basah terhadap sampel daun jeruk sambal untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia, misalnya tanah. Tanah mengandung bermacam-macam mikroba dalam jumlah yang tinggi, oleh karena itu pembersihan simplisia dari tanah yang terikut dapat mengurangi jumlah mikroba awal. Selanjutnya, sampel dicuci untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang masih melekat pada daun jeruk sambal. Tahapan terakhir adalah perubahan bentuk sampel dengan pemotongan daun jeruk sambal segar menjadi kecil-kecil (kominusi). Proses ini dilakukan untuk mengurangi ketebalan bahan hingga difusi dapat terjadi. Peningkatan difusi akan mempercepat penguapan dan penyulingan minyak atsiri. Pengecilan ukuran daun jeruk sambal dilakukan dengan menggunakan pisau yang terbuat dari *stainless steel*.

Penyulingan Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal

Prinsip dari metode ini sendiri adalah mengisolasi minyak atsiri yang berasal dari sampel daun jeruk sambal dengan cara mengalirkan uap air ke dalam tumpukan daun jeruk sambal segar yang sudah diiris tipis-tipis, sehingga minyak atsiri teruapkan bersama dengan uap air. Setelah pengembunan, minyak akan membentuk lapisan yang terpisah dari air akibat perbedaan berat jenis, dimana bagian minyak akan berada pada lapisan atas dan bagian air pada lapisan bawah yang selanjutnya minyak atsiri dapat dipisahkan dan dikumpulkan.

Pemilihan metode ini dalam mengisolasi minyak atsiri daun jeruk sambal segar didasarkan atas beberapa kelebihan yakni uap yang dihasilkan dari pemanasan air akan berpenetrasi secara merata ke dalam jaringan daun,

lama penyulingan relatif singkat, rendemen minyak lebih besar dan mutunya lebih baik jika dibandingkan dengan minyak hasil penyulingan dengan sistem penyulingan destilasi air. Total minyak atsiri yang berhasil diisolasi adalah sebesar 13,95 mL. Minyak atsiri selanjutnya di simpan dalam lemari es (pada suhu 4°C) dengan menggunakan vial berwarna gelap dimaksudkan untuk meminimalkan kemungkinan terjadinya oksidasi yang menyebabkan kerusakan minyak atsiri oleh panas, cahaya dan oksigen. Bobot jenis minyak atsiri daun jeruk sambal yang didapat adalah 0,911 gram/mL. Besar rendemen yang diperoleh adalah 0,1589%.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan metode analisis kualitatif kandungan golongan senyawa aktif pada minyak atsiri daun jeruk sambal, sehingga dapat diketahui senyawa yang terdapat di dalamnya karena sifatnya yang dapat bereaksi secara khas dengan pereaksi tertentu. Berikut hasil skrining fitokimia minyak atsiri daun jeruk sambal:

Tabel 2. Hasil Uji Skrining Fitokimia Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal

No.	Skrining Fitokimia	Hasil Uji
1.	Minyak Atsiri	+
2.	Alkaloid	-
3.	Flavonoid	+
4.	Tanin	-
5.	Saponin	-
6.	Glikosida	+
7.	Triterpenoid	+
8.	Steroid	-

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

Hasil skrining menunjukkan minyak atsiri daun jeruk sambal positif mengandung flavonoid, glikosida dan triterpenoid.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Terhadap Minyak Atsiri

Tujuan dilakukan pengujian aktivitas antibakteri ini adalah untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang dapat diberikan oleh minyak atsiri terhadap bakteri uji serta menentukan dosis minyak atsiri yang digunakan dalam gel. Berikut diameter hambatan yang dihasilkan dari pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk sambal:

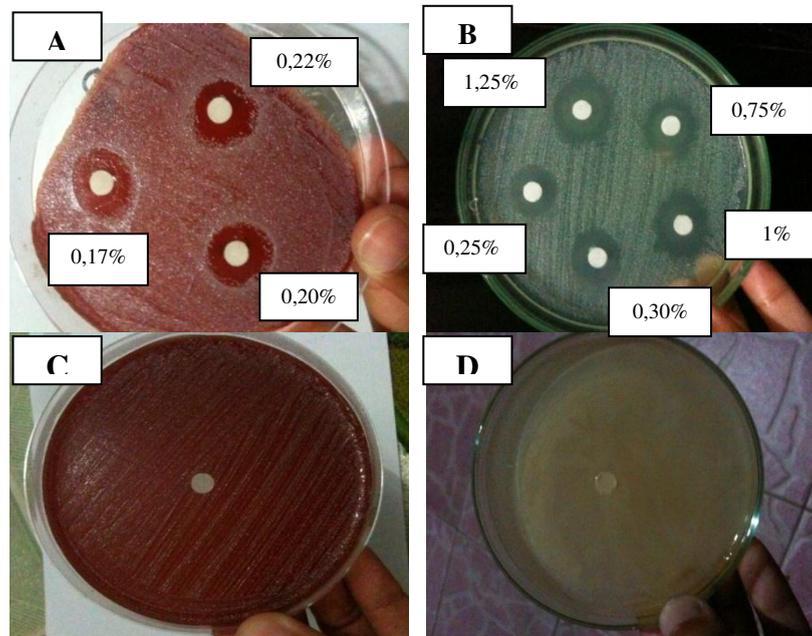
Tabel 3. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal

Bakteri Uji	Konsentrasi (mL/mL)	Rata-Rata Diameter Hambat (mm)
<i>P.acnes</i>	0,04%	0
	0,06%	0
	0,08%	0
	0,10%	0
	0,12%	0
	0,15%	0
	0,17%	11
	0,20%	14,67
	0,22%	19
	0,25%	+
	0,27	+
	0,5%	+
	0,75%	+
	1%	+
	1,25%	+
Kontrol (-)	0	
<i>S.epidermidis</i>	0,20%	0
	0,25%	11
	0,30%	11,67
	0,75%	14
	1%	16
	1,25%	19
	1,75%	21,67
	2%	21,67
	2,25%	22
	2,75%	23
3,25%	23	
Kontrol (-)	0	

Keterangan: tanda (+): bakteri uji tidak ada yang tumbuh (mati semua).

Berdasarkan tabel tersebut nilai KHM dari minyak atsiri daun jeruk sambal terhadap *Propionibacterium acnes* adalah pada konsentrasi 0,17%, sedangkan pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* adalah pada konsentrasi 0,25% dengan diameter hambat yang sama besarnya, yakni 11 mm. Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri maka semakin besar diameter hambat yang diberikan. Konsentrasi 0,04% hingga 0,12% pada pengujian terhadap *P.acnes* menunjukkan minyak atsiri daun jeruk sambal tidak memberikan diameter hambatan (0 mm), sedangkan pada konsentrasi 0,25% hingga 1,25% minyak atsiri menyebabkan terbentuknya daerah bening pada seluruh permukaan petri yang mengindikasikan bahwa minyak atsiri telah memberikan aktivitas bakterisidal. Beberapa antimikroba yang bersifat bakteriostatik dapat bersifat bakterisidal jika digunakan dalam dosis tinggi⁽¹⁴⁾. Pengujian pada kontrol negatif menunjukkan tidak terdapatnya zona hambat yang dihasilkan, ini membuktikan bahwa etanol 96% tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri minyak atsiri sehingga aman digunakan sebagai pelarut.

Mekanisme umum aktivitas antibakteri yang diberikan oleh minyak atsiri daun jeruk sambal dapat dijelaskan berdasarkan struktur dinding sel bakteri uji. Kedua bakteri uji merupakan bakteri Gram (+) dimana memiliki susunan dinding sel yang relatif lebih sederhana hanya terdiri dari komponen peptidoglikan dan asam teikoat, sehingga menyebabkan minyak atsiri dapat lebih mudah menembus dinding sel dan mempengaruhi bakteri uji. Selain itu, bakteri Gram (+) tidak mempunyai lapisan lipo-polisakarida yang melindungi membran, mengakibatkan minyak atsiri akan lebih mudah merusak protein porin, sehingga menyebabkan sel lisis⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾.



Gambar 1. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri.

Keterangan Gambar: Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal Terhadap *Propionibacterium acnes* (A). Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal Terhadap *Staphylococcus epidermidis* (B). Etanol 96% Terhadap *Propionibacterium acnes* (C). Etanol 96% Terhadap *Staphylococcus epidermidis* (D).

Berdasarkan kandungan senyawa minyak atsiri daun jeruk sambal hasil penelitian yang dilakukan oleh Yulliasri Jamal *et al*⁽⁴⁾, minyak atsiri daun jeruk sambal mengandung senyawa alkohol dan aldehida yang potensial sebagai antibakteri serta mengandung senyawa terpena teroksidasi yang sangat tinggi sehingga dapat menyebabkan sel lisis pada bakteri Gram (+).

Selain itu, dari hasil skrining fitokimia diketahui bahwa minyak atsiri daun jeruk sambal mengandung flavonoid dan triterpenoid. Mekanisme antibakteri flavonoid ialah dengan cara mengganggu aktivitas transpeptidase peptidoglikan sehingga pembentukan dinding sel terganggu dan sel mengalami lisis. Mekanisme antibakteri senyawa triterpenoid umumnya terjadi melalui pengrusakan membran sel bakteri karena sifat senyawa triterpenoid cenderung lipofilik⁽¹⁷⁾. Kerusakan membran sel

dapat terjadi ketika senyawa triterpenoid bereaksi dengan sisi aktif dari membran atau dengan melarutkan konstituen lipid dan meningkatkan permeabilitasnya. Membran sel bakteri terdiri dari fosfolipid dan molekul protein. Akibat peningkatan permeabilitas, senyawa triterpenoid dapat masuk ke dalam sel. Ketika di dalam sel, senyawa tersebut dapat melisiskan membran sel atau mengkoagulasi sitoplasma dari sel bakteri tersebut⁽¹⁸⁾.

Formulasi Gel

Berdasarkan konsistensi sediaan gel yang diamati secara visual F₁ memiliki konsistensi yang sedikit lebih encer dibandingkan F₂ dan F₃ sedangkan F₃ memiliki konsistensi yang lebih kental. Hal ini dikarenakan jumlah Carbopol yang divariasikan berbeda. Semakin banyak Carbopol yang digunakan dalam formulasi maka semakin kental sediaan yang dihasilkan. Hal ini disebabkan

tingginya viskositas cCarbopol yakni antara 30.500-39.400 *centipoises*. Semua gel kontrol negatif tampak bening dan berbau khas Carbopol (berbau asam), hal ini disebabkan penggunaan Carbopol yang dipilih sebagai salah satu bahan dasar gel berdasarkan bentuk dan penampakan gel yang ingin diperoleh yakni gel satu fase dan bening atau transparan, karena berdasarkan literatur bahan dasar gel tersebut merupakan golongan bahan sintetik yang bila diformulasi akan membentuk gel satu fase yang jernih. Sedangkan hidroksipropil-metilselulosa (HPMC) merupakan dasar gel semisintetik turunan selulosa⁽¹⁹⁾. Tetapi tampak gelembung udara yang terperangkap pada sediaan gel, sedangkan semua gel dengan penambahan minyak atsiri menunjukkan perubahan warna gel menjadi putih susu, bau khas minyak atsiri dan tidak tampak gelembung udara yang terperangkap. Warna gel minyak atsiri yang dihasilkan memang tidak bening dan transparan seperti sediaan gel kontrol tapi warna sediaan gel masih diperbolehkan hingga buram opak⁽²⁰⁾.

Uji Stabilitas Sediaan Gel

1. Uji Mikrobiologi Sediaan

Uji mikrobiologi sediaan gel minyak atsiri daun jeruk sambal dilakukan untuk mengetahui efektivitas minyak atsiri daun jeruk sambal setelah diformulasi dalam sediaan gel. Konsentrasi minyak atsiri yang digunakan dalam formulasi gel adalah konsentrasi 1%. Pemilihan konsentrasi 1% yang memberikan diameter hambat sebesar 16 mm didasarkan bahwa suatu antibakteri dikatakan memiliki aktivitas yang memuaskan dengan diameter hambatan kurang lebih sebesar 14 hingga 16 mm⁽²¹⁾, dengan klasifikasi memiliki kekuatan antibakteri yang kuat⁽²²⁾. Pemilihan konsentrasi 1% berdasarkan nilai konsentrasi terbesar diantara kedua bakteri uji yang memberikan aktivitas antibakteri dengan diameter hambat sebesar 16 mm, yakni pada

Staphylococcus epidermidis. Pengujian terhadap *Propionibacterium acnes* menggunakan konsentrasi minyak atsiri sebesar 1% memberikan aktivitas bakterisidal, tetapi setelah diformulasi menjadi sediaan gel, efektivitas antibakterinya menurun sehingga gel hanya dapat memberikan aktivitas bakteriostatik.

Tabel 4. Hasil Uji Mikrobiologi Sediaan Gel Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal Hari ke-0

Formula	Rata-Rata Diameter Daerah Hambatan (mm)			
	<i>P. acnes</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	Hari Ke-0	Hari Ke-29	Hari Ke-0	Hari Ke-29
F ₁	19,11	18,78	14	13,89
K ₁	0	0	0	0
F ₂	21,67	21	16	15
K ₂	0	0	0	0
F ₃	18,11	17,56	11,33	10,89
K ₃	0	0	0	0
Kontrol Positif	17	-	32	-

Keterangan: K₁ = Kontrol Formula 1

K₂ = Kontrol Formula 2

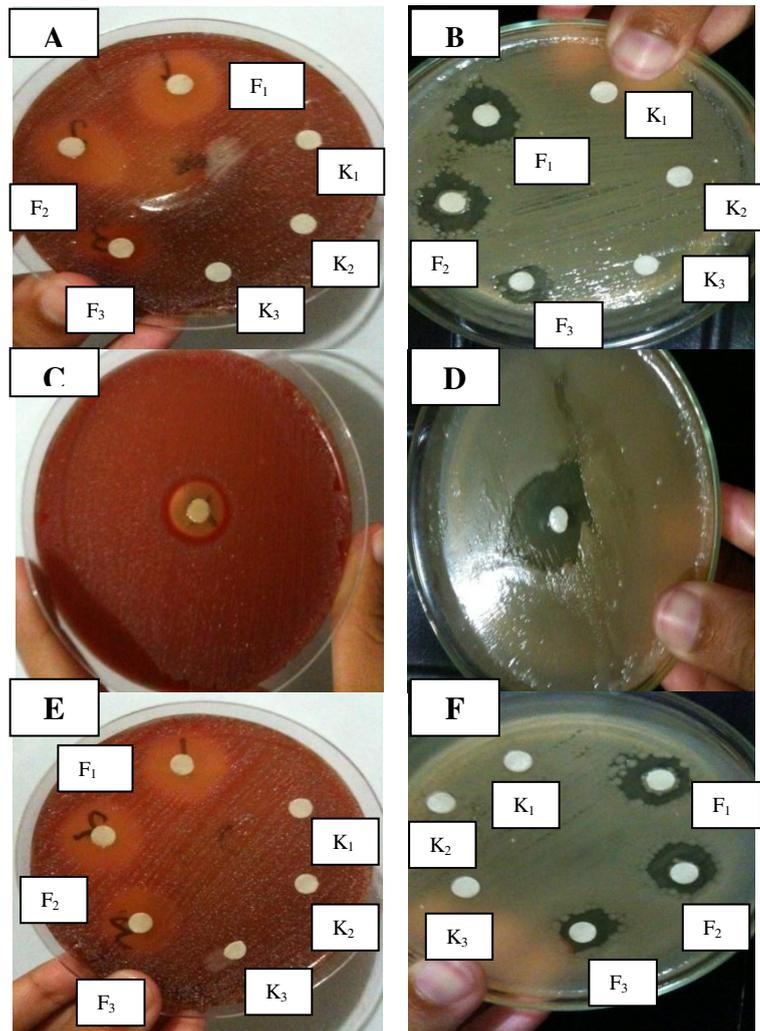
K₃ = Kontrol Formula 3

F₁ = Formula 1

F₂ = Formula 2

F₃ = Formula 3

Berdasarkan diameter hambat yang dihasilkan, F₂ memberikan diameter hambat yang paling besar diantara ketiga formula sehingga dapat disimpulkan efektivitas antibakteri gel minyak atsiri yang paling baik adalah pada F₂ terhadap kedua bakteri uji. Diduga F₂ merupakan formulasi optimum yang dapat melepaskan minyak atsiri pada media uji sehingga memberikan efektivitas yang paling besar. Berdasarkan diameter hambatan yang dihasilkan dapat ditarik simpulan gel minyak atsiri daun jeruk sambal memiliki efektivitas yang paling baik terhadap *P. acnes*.



Gambar 2. Hasil Uji Efektivitas Antibakteri.

Keterangan Gambar: Gel Uji Terhadap *Propionibacterium acnes* Hari Ke-0 (A). Gel Uji Terhadap *Staphylococcus epidermidis* Hari Ke-0 (B). Kontrol Positif Terhadap *Propionibacterium acnes* Hari Ke-0 (C). Kontrol Positif Terhadap *Staphylococcus epidermidis* Hari Ke-0 (D). Gel Uji Terhadap *Propionibacterium acnes* Hari Ke-29 (E). Gel Uji Terhadap *Staphylococcus epidermidis* Hari Ke-29 (F)

Kontrol negatif sediaan menunjukkan tidak ada diameter hambat, hal ini membuktikan bahwa setiap bahan yang digunakan tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji. Berdasarkan data penelitian ternyata terjadi penurunan efektivitas minyak atsiri daun jeruk sambal setelah diformulasi dalam sediaan gel. Penurunan efektivitas terjadi pada

semua gel uji setelah 30 hari penyimpanan. Penurunan efektivitas ini diduga karena penguapan sebagian zat aktif pada saat penyimpanan. Selanjutnya data dianalisis dengan program *R-Commander*. Analisis efektivitas gel uji terhadap kontrol positif dilakukan dengan uji *T independent* untuk data parametrik dan *Wilcoxon Rank Sum Test* untuk data non

parametrik. Berikut tabel analisis uji efektivitas gel uji terhadap kontrol positif.

Tabel 5. Hasil Uji Analisis Efektivitas Gel Minyak Atsiri Daun Jeruk Sambal terhadap Kontrol Positif

	Formula	P-value	Keterangan
<i>P.a</i>	F ₁ -K+	0,01217	Berbeda Signifikan
	F ₂ -K+	0,05935	Tidak Berbeda Signifikan
	F ₃ -K+	0,05935	Tidak Berbeda Signifikan
<i>S.e</i>	F ₁ -K+	0,0636	Tidak Berbeda Signifikan
	F ₂ -K+	0,0636	Tidak Berbeda Signifikan
	F ₃ -K+	0,05935	Tidak Berbeda Signifikan

Keterangan: K+ = Kontrol Positif

F₁ = Formula 1

F₂ = Formula 2

F₃ = Formula 3

Berdasarkan hasil analisis F₁ berbanding kontrol positif terhadap *P.acnes* memiliki nilai *p-value* sebesar 0,01217, dengan menggunakan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan *p-value*, dimana H₀ ditolak jika *p-value* < 0,05 dapat disimpulkan bahwa pengujian menunjukkan tolak H₀. Oleh karena itu, dapat dijelaskan bahwa rata-rata zona hambat F₁ berbanding zona hambat kontrol positif terhadap *P.acnes* adalah berbeda signifikan. Sedangkan, untuk formula lainnya, memiliki nilai *p-value* > 0,05 maka gagal tolak H₀. Oleh karena itu dapat dijelaskan bahwa rata-rata zona hambat F₂, F₃ berbanding kontrol positif terhadap *P.acnes* dan F₁, F₂, F₃ berbanding kontrol positif terhadap *S.epidermidis* adalah tidak berbeda signifikan atau tidak ada perbedaan.

2. Uji Pemeriksaan Organoleptik dan Homogenitas

Hasil pemeriksaan organoleptik gel minyak atsiri daun jeruk sambal tidak menunjukkan pemisahan fase,

perubahan warna, maupun perubahan bau. Hasil pemeriksaan homogenitas menunjukkan bahwa semua formula sediaan gel memiliki homogenitas yang baik. Hasil pengujian homogenitas ini sesuai dengan persyaratan Ekstra Farmakope Indonesia⁽²³⁾ yaitu jika sediaan topikal dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang cocok harus menunjukkan susunan yang homogen yang dapat dilihat dengan tidak adanya partikel yang bergerombol dan menyebar secara merata.

3. Uji Penentuan pH Sediaan

Hasil pengukuran pH gel selama 30 hari menunjukkan bahwa gel stabil pada pH 6,9. pH sediaan ini masih memenuhi persyaratan pH sediaan gel ideal, yakni berada pada rentang 6-8⁽²⁴⁾.

4. Uji Daya Sebar

Uji daya sebar memiliki tujuan untuk melihat kemampuan menyebarnya gel pada permukaan kulit dimana diharapkan gel mampu menyebar dengan mudah ditempat yang dioleskan tanpa diberikan tekanan yang berarti.

Daya sebar yang dihasilkan pada semua formulasi gel menunjukkan bahwa semakin lama penyimpanan maka daya sebar gel semakin meningkat. Daya sebar gel yang baik berada pada rentang 5-7 cm⁽²⁵⁾.

Salah satu faktor yang mempengaruhi daya sebar gel adalah jumlah dan kekuatan matriks gel. Semakin banyak dan kuat matriks gel maka daya sebar gel akan menurun. Dalam sistem gel yang bertanggung jawab terhadap terbentuknya matriks gel adalah *gelling agent*. Kenaikan konsentrasi *gelling agent* akan menambah dan memperkuat matriks gel. Oleh karena itu faktor dominan yang menentukan respon daya sebar adalah konsentrasi carbopol dalam basis. Semakin tinggi konsentrasi carbopol, maka semakin kecil daya sebar (F₃), kebalikannya semakin rendah konsentrasi carbopol maka semakin besar daya sebar (F₁). Daya sebar ini

juga berhubungan dengan viskositas gel yang dapat dijelaskan dengan semakin tinggi viskositas sediaan gel yakni pada F_3 maka akan semakin kecil daya sebar yang dihasilkan, semakin rendah viskositas sediaan gel yakni pada F_1

maka semakin besar daya sebar gel pada kulit. Selama penyimpanan, seluruh gel mengalami peningkatan daya sebar. Hal ini dapat disebabkan oleh suhu penyimpanan. Berikut tabel hasil daya sebar gel:

Tabel 6. Hasil Uji Daya Sebar Sediaan Gel

Formula	Luas Penyebaran (cm ²)										
	Hari ke-										
	0	2	5	8	11	14	17	20	23	26	29
F_1	7,302	7,585	7,709	8,212	8,505	8,550	8,679	8,766	8,853	8,942	8,942
F_2	6,640	6,678	6,832	7,263	7,383	7,544	7,585	7,625	7,626	7,708	7,836
F_3	6,267	6,456	6,489	6,602	6,603	6,717	6,755	6,831	6,832	6,909	7,693

Keterangan: F_1 = Formula 1
 F_2 = Formula 2
 F_3 = Formula 3

Uji *One Way* ANOVA dilakukan terhadap ketiga formula untuk melihat nilai signifikansi diantara ketiganya. Berikut tabel hasil analisis:

Tabel 7. Hasil Analisis *One Way Anova* Daya Sebar Gel

	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.446	33.801	0.000
Within Groups	0.220		

Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan bahwa uji F signifikansi pada kelompok uji ditunjukkan oleh nilai F hitung sebesar 33,801 yang lebih besar daripada F tabel, yakni 3,3 (melihat tabel Anova). Oleh karena itu, maka $F_{hitung} > F_{tabel}$ sehingga H_0 ditolak, yaitu rata-rata dari ketiga formula adalah berbeda. Lebih lanjut, dilihat dari nilai signifikansi probabilitasnya adalah 0,000 (<0,005) maka, H_0 ditolak. Berdasarkan nilai ini maka dapat ditarik kesimpulan bahwa perbandingan nilai daya sebar ketiga formula berbeda signifikan.

5. Hasil Uji Daya Lekat

Pengujian daya lekat dilakukan untuk mengetahui kemampuan gel melekat dikulit. Semakin besar nilai daya lekat

maka semakin besar difusi obat karena ikatan yang terjadi antara gel dengan kulit semakin lama. Berdasarkan data yang diperoleh semua sediaan gel memiliki daya lekat yang stabil yakni lebih dari 1 jam, bahkan setelah disimpan selama 30 hari.

Stabilnya daya lekat gel yang dihasilkan diduga karena tingginya konsistensi sediaan gel akibat penggunaan HPMC dan carbopol sebagai basis gel.

SIMPULAN

Konsentrasi minyak atsiri daun jeruk sambal (*X Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands) yang dapat memberikan aktivitas hambat minimum terhadap *Propionibacterium acnes* adalah sebesar 0,17% dan terhadap *Staphylococcus epidermidis* sebesar 0,25%. Konsentrasi minyak atsiri yang digunakan adalah sebesar 1%. Setelah diformulasi dalam bentuk sediaan gel, F_2 merupakan formula yang memberikan efektivitas antibakteri paling baik, dimana sediaan gel minyak atsiri daun jeruk sambal memiliki efektivitas yang lebih besar terhadap *Propionibacterium acnes* dan lebih kecil terhadap *Staphylococcus epidermidis* dibandingkan dengan kontrol positif.

Hasil uji stabilitas sediaan gel menunjukkan bahwa gel memiliki

homogenitas, nilai pH dan daya lekat yang stabil. Daya sebar gel meningkat selama 30 hari penyimpanan. Uji analisis *One Way Anova* menunjukkan bahwa daya sebar setiap formula gel berbeda signifikan. Uji efektivitas mikrobiologi gel menunjukkan penurunan efektivitas pada semua formulasi gel setelah 30 hari penyimpanan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wasitaatmadja, S.M. 1997. *Penuntun Ilmu Kosmetik Medik*. Jakarta: Penerbit UI-Press. Hal: 59 – 60, 182-188.
2. Oprica, C. 2004. Antibiotic-Resistant *Propionibacterium acnes* on the Skin of Patient With Moderate to Severe Acne. *Journal of Pharmacology*; 10(3). Hal: 155-164.
3. Quitsumbing, E. 1951. *Medicinal Plants of The Philippines*. Manila: Burea of Printing.
4. Yulliasri, J., Praptiwi dan Andria A. 2000. Komponen Kimia dan Efek Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Buah dan Daun Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa Bunge*). *Majalah Farmasi Indonesia* Vol. 11 (2). Hal: 77-85.
5. Lieberman, H.A. 1997. *Pharmaceutical Dosage Form: Disperse Sytems*, Vol. 1. New York: Marcell Dekker Inc. Hal: 315-319.
6. Ansel, H.C. 1989. *Pengantar Bentuk sediaan Farmasi*. Edisi 4. Jakarta: UI Press, Hal: 390-392.
7. Difco. 1977. *Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology and Clinical Laboratory Procedures*. 9th ed. DetroitMichigan: Difco Laboratories. Hal: 32, 33, 93-94.
8. Hadioetomo RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek, Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
9. ICMR. 2009. Detection of Antimicrobial Resistance in Common Gram Negative and Gram Positive Bacteria Encountered in Infectious deseases- An Update. *ICMR Bulletin ISSN 0377-4910* .Vol. 39 Hal: 1-3.
10. Suardi, M., Armenia dan Murhayati, A. 2009. Formulasi dan Uji Klinik Gel Anti Jerawat Benzoil Peroksida-HPMC. *Jurnal*. Fakultas Farmasi FMIPA UNHAD.
11. Depkes RI. 1979. *Farmakope Indonesia*. Edisi III. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal: 33, 612.
12. Ameliana, L. dan Lina W. 2011. Uji Aktivitas Antinyamuk Lotion Minyak Kunyit Sebagai Alternatif Pencegahan Penyebaran Demam Berdarah Dengue. *Jurnal Trop Pharmacy Chemical*. Vol 1 (2). Hal: 137-145
13. Voigt, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Penerjemah Dr. Soendani Noerono. Edisi Kelima. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Hal: 335, 359.
14. Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O. dan Iwatsuki T. 2001. Antibacterial Action of Deveral Tannins Against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48:487-91.
15. Jawetz, E. Menick, J.L. dan Adelberg, E.A. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. ed. 23. Ahli bahasa: Eddy Mudihardi. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal: 23, 225, 229.
16. More, F.N., 2007. Antimicrobial Properties of Conifers Essential Oil. *a Summary*. London: Thompsons Rivers University
17. Cowan MM. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564–82.
18. Banwart, G. J. (1981). *Basic Food Microbiology*. New York: Avi.
19. Hasyim, N., Faradiba dan Gina A.B. 2011. Formulasi Gel Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*

- L.). *Majalah Farmasi dan Farmakologi* Vol. 15 (1). Hal: 5-9.
20. Depkes RI. 1985. *Formularium Kosmetika Indonesia* Cetakan I. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
21. Depkes RI. 1995. *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal: 297, 321-323, 325.
22. Davis, W.W, Stout T.R. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay : II. Novel Procedure offering improve Accuracy. *Journals. ASM.org*. Vol 22 (4). Hal : 666.
23. Depkes RI. 1974. *Ekstra Farmakope Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
24. British Pharmacopoeia. 2009. *British Pharmacopoeia* Vol. 1 % 2. London: Medicine and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA). Hal: 4788.
25. Garg, A., Deepika A., Sanjay G. dan Anil K. S. 2002. Spreading of Semisolid Formulations An Update. *Pharmaceutical Technology. Ebook*. www.pharmtech.com.