

AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP BAKTERI *Propionibacterium acnes* PENYEBAB ACNE VULGARIS

SKRIPSI



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

Disusun Oleh:

NADYA SALSABILA

NIM: H91218049

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA**

2022

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Nadya Salsabila

NIM : H91218049

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2018

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul “**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP BAKTERI *Propionibacterium acnes* PENYEBAB ACNE VULGARIS**”. Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 5 Agustus 2022

Yang menyatakan,


Nadya Salsabila
NIM H91218049

HALAMAN PERSETUJUAN

SKRIPSI

AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP BAKTERI *Propionibacterium acnes* PENYEBAB ACNE VULGARIS

Diajukan oleh:

Nadya Salsabila

NIM. H91218049

Telah diperiksa dan disetujui
di Surabaya, 5 Agustus 2022

Dosen Pembimbing Utama



Eva Agustina, M.Si
NIP 198908302014032008

Dosen Pembimbing Pendamping



Misbakhul Munir, S.Si., M.Kes
NIP 198107252014031002

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Nadya Salsabila ini telah dipertahankan di depan tim penguji skripsi

Surabaya, 8 Agustus 2022

Mengesahkan.

Dewan Penguji

Penguji I



Eva Agustina, M.Si

NIP. 198908302014032008

Penguji II



Misbakhul Munir, S.Si., M.Kes

NIP. 198107252014031002

Penguji III



Saiful Bahri, M.Si

NIP. 198804202018011002

Penguji IV



Ika Mustika, M.Kes

NIP. 198702212014032004

Mengetahui,

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Ampel Surabaya



Dr. Saiful Hamdani, M.Pd

NIP. 196507312000031002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpustakaan@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Nadya Salsabila
NIM : H91218049
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI/ BIOLOGI
E-mail address : nadya.sb44@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK NIPIS (*CITRUS AURANTIFOLIA*)
TERHADAP BAKTERI PROPIONIUM ACNES PENYEBAB ACNE VULGARIS

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara **fulltext** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 31 Oktober 2022

Penulis

(Nadya Salsabila)

ABSTRAK

AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP BAKTERI *Propionibacterium acnes* PENYEBAB ACNE VULGARIS

Propionibacterium acnes merupakan suatu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit kulit yakni jerawat dan pengobatannya dapat menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik secara terus menerus dapat menimbulkan resistensi bakteri. Di era ini sudah banyak sekali penelitian mengenai pemanfaatan tanaman sebagai obat alami seperti tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas daun jeruk nipis terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Pada uji aktivitas antibakteri ini menggunakan ekstrak daun jeruk nipis. Uji fitokimia ekstrak dilakukan secara kualitatif menggunakan skrining fitokimia, sedangkan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi kertas cakram dengan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15%, 25%, 35 %, 50%, 70%, dan 100% yang digunakan untuk mengetahui daya hambat ekstrak, sedangkan metode dilusi dengan variasi konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78% digunakan untuk mengetahui nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Hasil uji fitokimia pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun jeruk nipis positif mengandung flavonoid, tanin, saponin, dan fenolik. Kadar total flavonoidnya sebesar 6,41 mg QE/g dan kadar total fenoliknya sebesar 36,52 mg GAE/g. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak daun jeruk nipis memiliki aktivitas antibakteri pada *Propionibacterium acnes*. Berdasarkan hasil analisis uji *Kruskall-Wallis* bahwa P value= 0,001 sehingga pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis berpengaruh nyata terhadap diameter zona hambat. Hasil diameter zona hambat tertinggi pada konsentrasi 100% sebesar 12 mm. Hasil uji dilusi diperoleh nilai KHM terbaik pada konsentrasi 50%. Nilai KBM tidak dapat ditentukan karena masih terdapat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* pada media agar.

Kata kunci: Antibakteri, *Citrus aurantifolia*, *Propionibacterium acnes*, Fitokimia, KHM, KBM

ABSTRACT

ACTIVITY OF LIME LEAF ETHANOL EXTRACT (*Citrus aurantifolia*) AGAINST BACTERIA *Propionibacterium acnes* CAUSES ACNE VULGARIS

Propionibacterium acnes is a bacterium that can cause skin diseases, namely acne and the treatment can use antibiotics. The continuous use of antibiotics can give rise to bacterial resistance. In this era, there have been many studies on the use of plants as natural medicines such as lime plants (*Citrus aurantifolia*). The purpose of this study was to determine the activity of lime leaves against the growth of *Propionibacterium acnes*. In this antibacterial activity test using lime leaf extract. The phytochemical test of the extract was carried out qualitatively using phytochemical screening, while quantitatively using a UV-Vis spectrophotometer. Antibacterial activity test using disc paper diffusion method with variations in concentration of 5%, 10%, 15%, 25%, 35%, 50%, 70%, and 100% which is used to determine the inhibitory power of the extract, while the dilution method with concentration variations of 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56%, and 0.78% is used to determine the values of MIC (Minimum Inhibition Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration). The results of phytochemical tests in this study showed that positive lime leaf extract contains flavonoids, tannins, saponins, and phenolics. The total flavonoid content was 6.41 mg QE/g and the total phenolic level was 36.52 mg GAE/g. The test results of antibacterial activity show that lime leaf extract has antibacterial activity on *Propionibacterium acnes*. Based on the results of the *Kruskall-Wallis* test analysis that P value = 0,001, so that the administration of various concentrations of lime leaf extract has a significant effect on the diameter of the inhibitory zone. The highest inhibition zone diameter yields at a concentration of 100% by 12 mm. The results of the dilution test obtained the best MIC value at 50% concentration. The MBC value cannot be determined because there is still a growth of *Propionibacterium acnes* on the agar medium.

Keywords: Antibacterial, *Citrus aurantifolia*, *Propionibacterium acnes*, Phytochemicals, MIC, MBC

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	iii
HALAMAN PERSETUJUAN	iv
PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI	v
LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
MOTTO	vii
HALAMAN PERSEMBAHAN	viii
KATA PENGANTAR	x
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	8
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.4 Manfaat Penelitian	9
1.5 Batasan Penelitian.....	9
1.6 Hipotesis Penelitian	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Jerawat (<i>Acne vulgaris</i>)	11
2.1.1 Definisi Jerawat (<i>Acne vulgaris</i>)	11
2.1.2 Tipe-tipe Jerawat	11
2.1.3 Faktor Penyebab Munculnya Jerawat	12
2.1.4 Pengobatan Jerawat	15
2.2 Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	15
2.2.1 Taksonomi Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	15
2.2.2 Morfologi Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	16
2.2.3 Patogenesis Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	16
2.3 Tanaman Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	17

2.3.1 Taksonomi Tanaman Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	17
2.3.2 Morfologi Tanaman Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>).....	18
2.3.3 Kandungan Daun Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	19
2.3.4 Manfaat Daun Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>).....	19
2.4 Senyawa Metabolit Sekunder	20
2.4.1 Senyawa Flavonoid	20
2.4.2 Senyawa Tanin.....	22
2.4.3 Senyawa Saponin.....	23
2.4.4 Senyawa Fenolik.....	25
2.5 Ekstraksi	27
2.5.1 Definisi Ekstraksi	27
2.5.2 Jenis-jenis Ekstraksi.....	27
2.6 Antibakteri.....	30
2.6.1 Definisi Antibakteri.....	30
2.6.2 Sifat Antibakteri.....	31
2.6.3 Mekanisme Kerja Antibakteri.....	32
2.6.4 Faktor yang Mempengaruhi Antibakteri	33
2.7 Metode Uji Aktivitas Antibakteri.....	34
2.7.1 Metode Difusi	35
2.7.2 Metode Dilusi	37
2.8 Sterilisasi	38
BAB III METODE PENELITIAN	42
3.1 Rancangan Penelitian	42
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	44
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	44
3.3.1 Alat.....	44
3.3.2 Bahan.....	45
3.4 Variabel Penelitian	45
3.4.1 Variabel Terikat	45
3.4.2 Variabel Bebas	45
3.4.3 Variabel Kontrol	45
3.5 Prosedur Kerja Penelitian	46
3.5.1 Pengumpulan Sampel.....	46
3.5.2 Preparasi Sampel	46
3.5.3 Ekstraksi Daun Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	46

3.5.4 Uji Skrining Fitokimia Daun Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>) Secara Kualitatif.....	47
3.5.5 Uji Skrining Fitokimia Daun Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>) Secara Kuantitatif.....	48
3.5.6 Sterilisasi Alat dan Bahan	51
3.5.7 Pembuatan Media	52
3.5.8 Peremajaan Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	53
3.5.9 Pembuatan Suspensi Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	53
3.5.10 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Uji Antibakteri Metode Difusi	53
3.5.11 Penentuan Aktivitas Antibakteri.....	55
3.6 Analisis Data	57
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	58
4.1 Ekstraksi Daun Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	58
4.2 Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i> S.)	62
4.2.1 Uji Skrining Fitokimia Kualitatif	63
4.2.2 Uji Skrining Fitokimia Kuantitatif	67
4.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>) .	72
4.3.1 Uji Difusi	72
4.3.2 Uji Dilusi	81
BAB V PENUTUP.....	88
5.1 Kesimpulan.....	88
5.2 Saran.....	89
DAFTAR PUSTAKA	90
LAMPIRAN.....	99

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kriteria daya antibakteri.....	36
Tabel 3.1 Jadwal pelaksanaan kegiatan penelitian.....	44
Tabel 4.1 Hasil uji fitokimia secara kualitatif.....	64
Tabel 4.2 Hasil uji fitokimia secara kuantitatif.....	70
Tabel 4.3 Hasil pengukuran diameter zona hambat.....	73
Tabel 4.4 Hasil analisis data uji normalitas.....	77
Tabel 4.5 Hasil analisis data uji homogenitas.....	77
Table 4.6 Hasil analisis data uji <i>Kruskall-Wallis</i>	78
Tabel 4.7 Hasil analisis data uji <i>Mann-Whitney</i>	78
Tabel 4.8 Hasil Pengukuran OD ekstrak daun jeruk nipis.....	81
Tabel 4.9 Hasil pengamatan KBM ekstrak daun jeruk nipis.....	83



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	16
Gambar 2.2 Daun jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	19
Gambar 2.3 Struktur senyawa flavonoid.....	21
Gambar 2.4 Struktur senyawa tanin	23
Gambar 2.5 Struktur senyawa saponin.....	24
Gambar 2.6 Struktur senyawa fenolik.....	26
Gambar 4.1 Ekstrak etanol daun jeruk nipis	61
Gambar 4.2 Hasil uji skrining fitokimia kualitatif.....	63
Gambar 4.3 Zona hambat ekstrak daun jeruk nipis.....	73
Gambar 4.4 Diagram grafik hasil rata-rata zona hambat	74
Gambar 4.5 Hasil pengamatan KBM.....	84



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat pernyataan identifikasi <i>Propionibacterium acnes</i>	99
Lampiran 2. Surat determinasi dan identifikasi daun jeruk nipis.....	101
Lampiran 3. Perhitungan rendemen ekstrak daun jeruk nipis.....	102
Lampiran 4. Perhitungan konsentrasi larutan baku standar kuersetin.....	102
Lampiran 5. Perhitungan kadar total flavonoid ekstrak daun jeruk nipis ..	103
Lampiran 6. Perhitungan konsentrasi larutan baku standar asam galat	104
Lampiran 7. Perhitungan kadar total fenolik ekstrak daun jeruk nipis	105
Lampiran 8. Perhitungan diameter zona hambat.....	106
Lampiran 9. Uji normalitas diameter zona hambat.....	107
Lampiran 10. Uji homogenitas diameter zona hambat	107
Lampiran 11. Uji <i>Kruskall-Wallis</i> diameter zona hambat.....	107
Lampiran 12. Uji <i>Mann-Whitney</i> diameter zona hambat	108
Lampiran 13. Perhitungan hasil uji KHM	123
Lampiran 14. Gambar dokumentasi penelitian	124



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada zaman modern ini, salah satu masalah kulit yang dapat membuat seseorang kurang percaya diri dengan penampilannya adalah jerawat atau *Acne vulgaris*. Madelina dan Sulistyarningsih (2018) menjelaskan bahwa jerawat (*Acne vulgaris*) merupakan suatu penyakit kulit yang diakibatkan karena peradangan kronis dengan patogenesis kompleks yang melibatkan kelenjar sebacea, kolonisasi bakteri berlebihan, reaksi imun tubuh, hiperkeratinisasi folikular, dan inflamasi. Jerawat biasanya muncul pada permukaan kulit wajah, dada, leher dan punggung (Madelina dan Sulist yarningsih, 2018).

Menurut Okoro, et al (2016) menyatakan bahwa jerawat adalah penyakit kulit umum yang menyerang 85% populasi manusia di dunia dengan rentan usia 11-30 tahun. Prevalensi penderita jerawat (*Acne vulgaris*) di Indonesia berkisar 80-85% pada remaja berusia 15-18 tahun, 12% pada wanita berusia lebih dari 25 tahun, dan 3% pada usia 35-44 tahun (Hafianty, dkk., 2021). Hal ini disebabkan adanya peningkatan hormon estrogen dan progesteron pada remaja perempuan serta hormon testosteron pada remaja laki-laki yang menyebabkan peningkatan produksi kelenjar minyak dan keringat (Kemenkes RI, 2012).

Selain itu, jerawat muncul dapat dipicu oleh beberapa faktor antara lain penggunaan kosmetik yang tidak sinkron dengan jenis kulit, kecemasan berlebih yang berujung pola makan tidak sehat, faktor hormonal, dan adanya inflamasi yang disebabkan oleh faktor genetik, meningkatnya aktivitas bakteri penyebab jerawat yang dapat menyumbat folikel rambut (Zaenglein, 2016). Jerawat yang muncul

disebabkan oleh adanya aktivitas kelenjar minyak kulit yang terlalu aktif sehingga pori-pori kulit mengalami penyumbatan akibat timbunan lemak yang berlebihan. Apabila timbunan lemak yang berlebihan ini bercampur dengan keringat, debu, dan kotoran lain maka dapat menyebabkan timbunan dengan bintik-bintik hitam di atas yang disebut komedo. Apabila pada komedo terjadi infeksi yang disebabkan oleh bakteri, maka terjadi peradangan yang dapat dikenal dengan istilah jerawat. Peradangan tersebut ditimbulkan oleh bakteri *Propionibacterium acnes* (Wardani, 2020).

Propionibacterium acnes merupakan suatu bakteri gram positif yang berbentuk batang dan memiliki kemampuan untuk mengubah asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak jenuh yang memungkinkan sebum menjadi menggumpal (Prasad, 2016), sehingga menyebabkan jerawat pada kulit (Fabbrocini, et al., 2010). Apabila jumlah sebum meningkat, maka jumlah *Propionibacterium acnes* yang keluar dari kelenjar sebacea bertambah banyak, hal ini dikarenakan bakteri tersebut merupakan pemakan lemak (Hafsari, et al., 2015) *Propionibacterium acnes* memproduksi enzim hidrolase yang dapat menyebabkan kerusakan folikel pilobasea. Aktivitas dari produksi enzim hidrolase ini menghasilkan neurimidase, lipase, protease, lesitinase, dan hyaluronidase yang menyebabkan terjadinya inflamasi (Hafsari, et al., 2015).

Pengobatan jerawat dapat dibagi berdasarkan tingkat keparahannya. Pada jerawat dengan tingkat ringan sampai sedang dapat diberikan terapi topikal, sedangkan pada jerawat dengan tingkat sedang hingga berat dapat diberikan kombinasi terapi topikal dan oral. Terapi jerawat dapat dimulai dengan pembersihan wajah pada pagi dan malam hari menggunakan sabun wajah. Sebagian

besar, sabun wajah telah mengandung senyawa antibakteri seperti triclosan yang mampu menghambat kokus bakteri gram positif (Yenny, dkk., 2011), banyak sabun wajah yang sudah mengandung asam salisilat dan benzoil peroksida yang dapat dijadikan terapi topikal terhadap jerawat dengan tingkat keparahan ringan hingga sedang (Hafsari, et al., 2015).

Selain itu, pengobatan jerawat dapat dilakukan secara *in vitro* pada tingkat keparahan sedang hingga berat dengan terapi oral menggunakan antibiotik, karena *Propionibacterium acnes* sangat sensitif terhadap antibiotik (Ramdani, 2015). Antibiotik adalah suatu senyawa yang dihasilkan oleh mikroba dan memiliki kinerja untuk menghambat maupun membunuh pertumbuhan bakteri. Antibiotik bersifat bakterisid baik pada golongan bakteri gram positif maupun gram negatif. Kinerja dari antibiotik yaitu dengan cara menghambat aktivitas sintesis protein pada bakteri, memperbaiki abnormalitas folikel, menurunkan produksi sebum, menurunkan jumlah koloni *Propionibacterium acnes*, dan menurunkan tingkat peradangan pada kulit (Apriani, dkk., 2014). Jenis antibiotik yang digunakan untuk menghambat atau membunuh *Propionibacterium acnes* yaitu klindamisin, eritromisin, doksisisilin, dan tetrasiklin, serta obat – obatan yang memiliki efek samping yaitu munculnya iritasi pada kulit. Penggunaan antibiotik secara berkelanjutan dapat menimbulkan beberapa efek samping yaitu bakteri akan resisten terhadap tubuh karena penggunaan antibiotik yang tidak rasional (Wardani, 2019). Ventola (2015) juga menambahkan bahwa resistensi tubuh terhadap antibiotik disebabkan oleh beberapa faktor yaitu pemberian resep antibiotik yang berlebihan, durasi pemakaian antibiotik yang tidak diselesaikan, dan jenis antibiotik yang dipilih.

Pengaplikasian antibiotik secara tidak rasional dapat menyebabkan gangguan seperti menyebabkan ISPA, peradangan pada usus, menyebabkan kanker, merusak fungsi organ, dan mengalami imunohipersensitivitas (Andrea, dkk., 2012). Sebagai alternatif lain dalam menanggulangi resistensi *Propionibacterium acnes* terhadap antibiotik, sudah banyak penelitian mengenai obat alternatif pengganti antibiotik sintesis yaitu menggunakan bahan alami seperti ekstrak dari suatu tanaman. Kandungan senyawa yang terdapat dalam suatu ekstrak tanaman berpotensi besar untuk dimanfaatkan sebagai antibakteri alami yang digunakan untuk mengobati penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Penelitian mengenai antibakteri alami ini masih terus dilakukan pada tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Indiarito, dkk (2019) bahwa ekstrak etil asetat daun binahong yang memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*, karena ekstrak tersebut mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu tanin, flavonoid, saponin, dan fenol. Pada penelitian Sa'adah, et al (2020) menggunakan ekstrak air kulit bawang merah dengan variasi konsentrasi 40%, 20%, 10%, dan 5% yang terbukti efektif dalam menghambat *Propionibacterium acnes* dengan kriteria daya hambat dari range kuat hingga sangat kuat. Hal ini disebabkan oleh adanya kandungan senyawa aktif seperti flavonoid, tanin, dan saponin yang efektif sebagai zat antibakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Sugiarti dan Fitriyaningsih (2018) bahwa pemberian ekstrak etanol daun parijoto dapat memberikan efek antibakteri dengan membentuk zona hambat pada media uji yang berisi bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*. Diameter zona hambat yang terbentuk pada

Propionibacterium acnes sebesar 6,85 mm, sedangkan pada *Staphylococcus aureus* sebesar 5,07 mm sehingga kriteria daya hambat ekstrak etanol daun pari-joto terhadap kedua bakteri tersebut tergolong sedang. Pada ekstrak etanol daun pari-joto ini lebih menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* dibandingkan *Staphylococcus aureus* karena *Propionibacterium acnes* lebih sensitif dan dinding peptidoglikannya mudah mengalami lisis apabila bereaksi dengan senyawa aktif seperti flavonoid, tanin, dan saponin. Pada penelitian Ismarani (2014) menggunakan kombinasi ekstrak batang dan daun pacar air memberikan aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Propionibacterium acnes*. Ekstrak kombinasi batang dan daun pacar air dengan konsentrasi 200 mg/ml membentuk diameter zona hambat pada *Staphylococcus epidermidis* sebesar 9,83 mm dan *Propionibacterium acnes* sebesar 15,53 mm. Sedangkan, pada penelitian yang dilakukan oleh Aida, et al (2016) menyatakan ekstrak etanol biji kakao terbukti efektif dalam menghambat aktivitas pertumbuhan *Propionibacterium acnes* dengan membentuk diameter zona hambat sebesar 16,80 mm pada konsentrasi maksimum, sedangkan pada konsentrasi minimum zona hambat yang terbentuk 10,70 mm. perbedaan nilai zona hambat ini membuktikan bahwa semakin menurun konsentrasi suatu ekstrak sebagai antibakteri maka nilai diameter zona hambat yang terbentuk semakin kecil.

Pemanfaatan tanaman sebagai obat herbal untuk menyembuhkan infeksi penyakit oleh masyarakat telah dilakukan sejak dahulu. Namun, penemuan masyarakat mengenai tanaman sebagai obat penawar penyakit belum ada bukti ilmiahnya. Penciptaan tanaman dilakukan oleh Allah SWT sebagai bukti kebesaran-Nya. Allah SWT menciptakan tanaman untuk dimanfaatkan sebaik-

baiknya oleh umat-Nya. Allah SWT juga telah berfirman dalam QS. Asy – Syuara ayat 7 yang berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?”.

Ayat tersebut menyebutkan bahwa terdapat berbagai spesies tanaman yang dapat hidup dengan baik di muka bumi ini dengan adanya pertolongan dari air hujan, kemudian tanaman digolongkan menjadi tanaman tingkat rendah yang merupakan tanaman yang bagian organnya seperti bagian akar, batang, daun, bunga, buah, dan bijinya belum diketahui dengan jelas, serta tanaman tingkat tinggi yang dimana memiliki bagian organ yang sudah jelas juga bisa dibedakan akar, batang, daun, bunga, dan bijinya. Biasanya, anggota organ tanaman yang digunakan sebagai media pengobatan yaitu akar, batang, buah, daun, rimpang, bunga, dan bijinya (Evika, 2008). Tanaman yang baik merupakan tanaman yang bermanfaat bagi makhluk hidup lainnya. Tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat penawar segala infeksi penyakit. Allah telah menganugerahkan tanaman kepada manusia dengan bentuk dan fungsi sebaik-baiknya dan Allah mengutus manusia untuk mempelajari dan memanfaatkan tanaman dengan sebaik mungkin sebagaimana firman Allah yang telah di ditetapkan dalam Al-Qur’an. Masyarakat sudah lama memanfaatkan tanaman sebagai obat tradisional yang digunakan untuk pengobatan alternatif dalam menyembuhkan berbagai penyakit, contohnya tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan tanaman yang termasuk ke dalam jenis perdu. Tanaman ini beranting dan bercabang. Tanaman ini berhabitat di benua Asia. Tanaman ini dapat tumbuh

dengan subur di area yang memiliki iklim tropis dengan kemiringan tanah berkisar 30%. Jeruk nipis termasuk famili Rutaceae dan genus *Citrus* (Prastiwi dan Ferdiansyah, 2017). Jeruk nipis dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat untuk meningkatkan nafsu makan, mengobati diare, anti-inflamasi, antimikroba, antiopiuretik, dan obat diet, karena tanaman tersebut mengandung senyawa metabolit sekunder (Mursito, 2006).

Kandungan senyawa metabolit sekunder dalam tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagian besar berkhasiat baik bagi tubuh seperti senyawa flavonoid. Flavonoid merupakan turunan senyawa fenol yang berfungsi sebagai antibakteri, antifungi, antioksidan, antikanker, dan antikolesterol (Prastiwi dan Ferdiansyah, 2017). Dalam penelitian Sandoval-Montemayor, et al (2012) bahwa ekstrak n-heksana *Citrus aurantifolia* dapat digunakan untuk terapi penyakit tuberculosis. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang sensitif hingga resisten terhadap antibiotik Streptomisin, Isonlasid, dan Etambutol. Ekstrak ini mengandung flavonoid yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dengan nilai KHM 25-50 µg/ml. Ekstrak jeruk nipis tidak memiliki efek toksisitas pada tubuh. Adapun bagian tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang dapat digunakan sebagai media pengobatan adalah daunnya (Siregar, et.al., 2020). Daun jeruk nipis biasanya digunakan sebagai antioksidan dan antibakteri. Pada penelitian yang dilakukan oleh Yanuarty (2021) menggunakan ekstrak etanol daun jeruk nipis mengandung senyawa aktif yaitu flavonoid seperti kuersetin dan senyawa fenolik yang memiliki sifat antioksidan dengan andungan kadar total fenolik sebesar 0,687 mg GAE/g. Ekstrak etanol daun jeruk nipis terhadap kuersetin dan DPPH memiliki nilai IC₅₀ yaitu 98,58 µg/ml. Hal

ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jeruk nipis memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Sedangkan, penelitian dari Siregar, et al (2020) bahwa infusa daun jeruk nipis dengan akuades mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan saponin. Infusa daun jeruk nipis efektif sebagai. Pada aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi, infusa daun jeruk nipis membentuk diameter zona hambat sebesar 11,7 mm pada *E. coli* dengan kriteia daya hambat kuat. Dapat disimpulkan bahwa infusa daun jeruk nipis juga efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli* penyebab diare.

Berdasarkan pemaparan latar belakang, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui manfaat daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai antibakteri. Penelitian ini menggunakan pelarut yaitu etanol 96% yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa aktif daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang digunakan sebagai agen antibakteri. Metode uji aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) menggunakan uji difusi untuk mengetahui diameter zona hambat, dilanjutkan dengan uji dilusi untuk mengetahui nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) pada konsentrasi yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif.

1.2 Rumusan Masalah

- a. Apa kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)?
- b. Berapa kadar total flavonoid dan kadar total fenolik pada ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)?

- c. Bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acnes*?

1.3 Tujuan Penelitian

- a. Mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).
- b. Mengetahui kandungan kadar total flavonoid dan kadar total fenolik pada ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).
- c. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.

1.4 Manfaat Penelitian

- a. Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dan pengetahuan baru bagi peneliti bahwa ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*.
- b. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai manfaat dari ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) bagi penelitian selanjutnya, sehingga manfaat ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) dapat dikembangkan lebih lanjut seiring dengan kemajuan teknologi.
- c. Penelitian ini dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai informasi dan dapat memberi dalam pembuatan obat antibakteri menggunakan bahan alami dari ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.)
- d. Penelitian ini diperlukan dapat memberikan informasi dan data untuk melakukan penelitian selanjutnya mengenai ekstrak etanol daun jeruk nipis terhadap *Propionibacterium acnes*.

1.5 Batasan Penelitian

- a. Bagian organ tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) yang digunakan pada penelitian yaitu bagian daunnya.
- b. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi.
- c. Etanol 96% merupakan pelarut yang digunakan dalam penelitian ini.
- d. Bakteri *Propionibacterium acnes* merupakan bakteri digunakan dalam penelitian ini dan ditumbuhkan pada media tumbuh *Nutrien agar* dan media uji aktivitas antibakteri *Mueller Hinton Agar* dan *Mueller Hinton Broth*.
- e. Uji fitokimia kualitatif digunakan peneliti untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, saponin, dan fenolik.
- f. Uji fitokimia kuantitatif digunakan peneliti untuk mengetahui kadar total flavonoid dan kadar total fenolik.
- g. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi yang digunakan untuk mengukur diameter zona bening (mm) dan metode dilusi digunakan untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) serta konsentrasi bunuh minimum (KBM).

1.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jerawat (*Acne vulgaris*)

2.1.1 Definisi Jerawat (*Acne vulgaris*)

Jerawat merupakan suatu gangguan kesehatan kulit yang menyebabkan inflamasi juga penyumbatan saluran pilosebacea, saluran pilosebacea adalah saluran kelenjar minyak kulit dan rambut (Tranggono, dkk., 2007). Inflamasi ini ditimbulkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Propionibacterium acnes*. Umumnya, jerawat sering muncul pada permukaan kulit dada, leher, punggung dan wajah (Wardani, 2020).

Mekanisme pembentukan jerawat yaitu apabila saluran pilosebacea mengalami penyumbatan, maka sebum tidak dapat keluar yang kemudian mengumpul dalam saluran dan saluran mengalami pembengkakan sehingga terbentuklah komedo. Komedo yang menyebabkan munculnya jerawat (Hafsari, 2015).

2.1.2 Tipe-tipe Jerawat

a. Tipe Jerawat Komedo

Komedo merupakan jerawat yang tidak menyebabkan rasa sakit. Hal ini dikarenakan jenis jerawat komedo hanya muncul apabila pori-pori kulit wajah tersumbat oleh minyak dan sel kulit mati. Menurut (Ray, et al., 2013) bahwa komedo dibedakan menjadi dua jenis yaitu:

1. Komedo Putih (*Whitehead*)

Komedo yang tertutup yang memiliki ciri-ciri berbentuk bintik kecil dan berwarna putih serta terletak di dalam kulit.

2. Komedo Hitam (*Blackhead*)

Komedo yang terbuka pada permukaan kulit. Komedo hitam ini terbentuk karena adanya oksidasi langsung dengan udara.

b. Tipe Jerawat Papula

Komedo yang tidak diberi pengobatan sehingga kondisinya memburuk menjadi benjolan merah saat dinding kelenjar yang terinfeksi mengalami kerusakan sehingga memungkinkan campuran antara sebum dan bakteri menembus kulit di sekitarnya. Kemudian, sel darah putih akan masuk ke kelenjar yang rusak untuk melawan bakteri yang menyebabkan inflamasi (Ray, et al., 2013).

c. Tipe Jerawat Pustula

Jerawat pustula terjadi beberapa hari kemudian saat sel darah putih keluar ke permukaan kulit. Ciri-ciri dari jerawat pustula yaitu adanya noda di bagian tepi, apabila meradang jerawatnya berwarna kemerahan dan bagian tengahnya berwarna putih atau kekuningan (Ray, et al., 2017).

2.1.3 Faktor Penyebab Munculnya Jerawat

Jerawat terjadi karena adanya aktivitas inflamasi kronis dari folikel polisebaceous yang diikuti dengan penimbunan dan penyumbatan keratin pada kulit yang kemudian menimbulkan komedo, pustula, nodula, dan kista. Ada beberapa faktor yang menyebabkan timbulnya jerawat, sebagai berikut:

a. Jenis Kulit Wajah

Kulit wajah sangat berbeda dengan bagian kulit tubuh lainnya, karena dalam kulit wajah memproduksi kelenjar sebacea lebih tinggi yang dapat menghasilkan asam lemak. Ada tiga macam jenis kulit yaitu kulit normal, kulit kering, dan kulit berminyak. Jerawat sering muncul pada individu yang memiliki kulit jenis berminyak, karena adanya perubahan susunan hormon yang merangsang produksi kelenjar sebacea (Prayitno dan Brahmani, 2011).

b. Kebersihan Kulit Wajah

Kebersihan kulit wajah merupakan salah satu faktor penyebab timbulnya jerawat. Kulit wajah yang kotor dapat memicu produksi sebum yang berlebih sehingga dapat menyumbat pori-pori kulit, menyebabkan komedo. Apabila kulit yang kotor terinfeksi oleh bakteri maka kulit dapat memunculkan jerawat yang meradang hingga mengeluarkan nanah (Prayitno dan Brahmani, 2011).

c. Faktor Hormonal

Faktor hormonal merupakan salah satu penyebab terjadinya jerawat, karena adanya aktivitas sekresi kelenjar sebacea yang sangat aktif sehingga memicu produksi hormon androgen yang berlebihan. Jerawat yang muncul akibat faktor hormonal ini sering terjadi pada remaja karena telah memasuki masa pubertas dimana produksi kelenjar sebacea yang tinggi pada kulit. Selain itu, jerawat muncul pada wanita yang sedang atau akan menstruasi karena meningkatnya hormon luteinizing (Prayitno dan Brahmani, 2011).

d. Kosmetik

Penggunaan kosmetik secara berlebihan dalam jangka waktu yang lama dan secara terus menerus dapat menyebabkan kulit wajah berjerawat seperti munculnya komedo yang terdapat pada bagian T-Zone. Contoh jenis kosmetik yang dapat

menimbulkan jerawat yaitu bedak, cream, moisturizer (pelembab), sabun wajah yang tidak sesuai dengan jenis kulit, micellar water yang tidak sesuai jenis kulit, dan sunscreen (Prayitno dan Brahmani, 2011).

e. Makanan

Makanan merupakan pemicu timbulnya jerawat khususnya pada makanan banyak mengandung karbohidrat, lemak, dan berkalori tinggi. Tetapi, ada beberapa ahli yang tidak membenarkan bahwa makanan dapat menyebabkan munculnya jerawat (Prayitno dan Brahmani, 2011).

f. Kesehatan Mental

Kesehatan mental seperti stress dapat memicu timbulnya jerawat, karena kelenjar sebacea diproduksi secara meningkat. Hal ini dapat terjadi karena kenaikan produksi hormon (Prayitno dan Brahmani, 2011).

g. Konsumsi Obat

Obat-obatan syang dikonsumsi secara berlebihan seperti obat-obatan terlarang (narkotika) dan kortikosteroid dapat memicu aktivitas sekresi dari kelenjar lemak meningkat sehingga jerawat muncul hingga menyebabab peradangan.

h. Iklim

Perubahan iklim yang sering terjadi dapat menimbulkan munculnya jerawat. Umumnya, jerawat akan mudah timbul pada tingkat kelembaban yang tinggi seperti pada musim penghujan atau musim dingin. Pada kedua musim ini matahari tidak muncul sehingga kulit lebih sedikit terpapar sinar uv. Sinar uv sendiri berfungsi untuk mematikan bakteri patogen yang hidup pada permukaan kulit (Prayitno dan Brahmani, 2011).

2.1.4 Pengobatan Jerawat

Pengobatan jerawat dengan pengobatan topikal. Pengobatan ini mengandung sulfur dan antigen. Selain itu, pengobatan secara sistemik juga diterapkan dengan pemberian antibiotik diantaranya tetrasiklin dan eritromisin. Namun, penggunaan antibiotik secara berkelanjutan dapat menyebabkan resistensi. Resistensi merupakan kemampuan bakteri untuk melawan efek dari antibiotik (Zahrah, et al., 2018).

Pengobatan jerawat dibedakan berdasarkan tingkat keparahannya, pada jerawat ringan penanganan yang diberikan hanya pengobatan antibiotik topikal seperti benzoil peroksida atau asam retinoal. Umumnya, benzoil peroksida mampu melawan bakteri jerawat pada konsentrasi 2,5-10%. Pada jerawat sedang penanganan yang diberikan antibiotik topikal dan ditambahkan antibiotik oral dengan menggunakan doksisisiklin atau antibiotik lain, dan jerawat berat penanganan yang diberikan isotretinoin oral, apabila terjadi inflamasi parah dapat diberikan triamcinolone intralesi (Zahrah et al., 2018).

2.2 Bakteri *Propionibacterium acnes*

2.2.1 Taksonomi Bakteri *Propionibacterium acnes*

Klasifikasi dari *Propionibacterium acnes* menurut Brook et. al (2005) sebagai berikut:

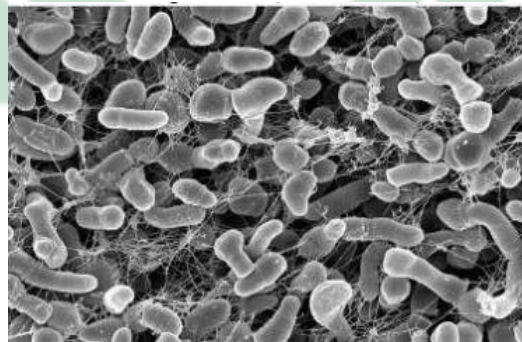
Kerajaan	: Bacteria
Divisi	: Actinobacteria
Kelas	: Actinobacteriade
Bangsa	: Actinomycetales
Suku	: Propionibacteriaceae

Marga : *Propionibacterium*

Jenis : *Propionibacterium acnes*

2.2.2 Morfologi Bakteri *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes adalah salah satu kelompok dari bakteri gram positif (Fauzi, 2014). Berdasarkan susunan dan morfologinya bakteri *Propionibacterium acnes* termasuk dalam kelompok Corynebacterium yang tidak bersifat toksigenik. Karakteristik dari *Propionibacterium acnes* yaitu berbentuk batang yang tidak beraturan yang terlihat dalam pewarnaan gram positif. Pewarnaan gram positif yaitu apabila diberi perlakuan pewarnaan gram maka bakteri tersebut tetap mempertahankan warna violet. Bakteri ini dapat berbentuk filamen bercabang atau campuran antara bentuk filamen dan bentuk kokoid. Gambar 2.1 merupakan bakteri *Propionibacterium acnes* yang diamati dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM).



Gambar 2.1 Bakteri *Propionibacterium acnes*
Sumber: Zahrah, et al., 2018

Pertumbuhan dari bakteri *Propionibacterium acnes* relatif lambat dan bersifat anaerob fakultatif yang toleran terhadap udara. Bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada suhu 30-37°C. Beberapa dari bakteri ini bersifat patogen pada hewan dan tanaman (Hanuzar et al., 2017).

2.2.3 Patogenesis Bakteri *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes ini merupakan floral normal pada kulit tubuh manusia yang berperan dalam membentuk jerawat. Mekanisme pembentukan jerawat yang disebabkan oleh *Propionibacterium acnes*, yaitu dengan mengeluarkan enzim hidrolitik yang bertugas untuk merusak folikel polisebasea kemudian menghasilkan neurimidase, lestinase, lipase, protease, dan hialuronidase yang memiliki peran utama pada proses inflamasi.

Menurut Harahap (2000) menyatakan bahwa bakteri *Propionibacterium acnes* mampu mengubah asam lemak tidak jenuh menjadi asam lemak yang jenuh sehingga menyebabkan sebum (zat berminyak berwarna kekuningan yang dihasilkan di kelenjar sebacea) padat (Lim, *et.al.*, 2019). Apabila produksi sebum semakin bertambah, maka bakteri ini akan bertambah banyak dan keluar dari kelenjar sebacea karena bakteri ini adalah pemakan lemak. Kelenjar sebacea ini berada dalam seluruh tubuh kecuali di telapak tangan dan telapak kaki (Hoover, *et.al.*, 2020).

2.3 Tanaman Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

2.3.1 Taksonomi Tanaman Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Tanaman *Citrus aurantifolia* S. (Jeruk nipis) merupakan tanaman perdu. Tanaman ini beranting dan bercabang. Tanaman ini berhabitat di benua Asia. Tanaman ini tumbuh dengan subur di area yang memiliki iklim tropis dengan kemiringan tanah berkisar 30%. Jeruk nipis termasuk famili Rutaceae dan genus *Citrus* (Prastiwi dan Ferdiansyah, 2017). Adapun klasifikasi dari tanaman *Citrus aurantifolia* S. (Jeruk nipis) menurut (Backer, 1911 dalam Sunarjono, 2010), sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Prutales
Suku	: Rutaceae
Marga	: <i>Citrus</i>
Jenis	: <i>Citrus aurantifolia</i>

2.3.2 Morfologi Tanaman Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) berakar tunggang. Tanaman ini memiliki tinggi sekitar 1,5 – 3,5 m. Batangnya berkayu dan berbentuk bulat. Batang yang masih muda berwarna hijau. Sedangkan, batang yang sudah tua berwarna coklat. Arah tumbuh batangnya menggantung, artinya batang tumbuh tegak lurus ke atas setelah itu ujung batangnya membengkok kembali ke bawah. Daun jeruk nipis merupakan daun tunggal. Bentuk daunnya adalah jorong hingga oval atau bulat telur. Ujung daunnya tumpul hingga meruncing, tepi daunnya beringgit, dan pangkal daunnya tumpul. Tangkai daunnya bersayap sempit. Ukuran panjang daunnya kira-kira 2,5-9 cm dan lebar daunnya 2-5 cm. Permukaan atas daun berwarna hijau mengkilap, sedangkan permukaan bawah daun berwarna hijau muda dapat lihat pada gambar 2.2. Daunnya memiliki aroma yang harum (Kholis, 2013).

Bunga dan buah dari Jeruk nipis mulai muncul pada usia 30 bulan setelah penanaman. Bunga jeruk nipis merupakan bunga majemuk. Bunganya tersusun dalam malai yang keluar dari ketiak daun. Bunganya berbentuk bintang, berwarna putih, dan beraroma harum. Diameter bunganya sekitar 1,5-2,5 cm. Bentuk dari

buah jeruk nipis yaitu oval hingga bulat. Buahnya berwarna hijau saat masih muda kemudian berwarna kuning saat buahnya sudah tua. Buahnya berukuran kecil. Kulit buah jeruk nipis cenderung tipis. Buah jeruk nipis mengandung banyak biji yang berukuran kecil dan berwarna putih. Bijinya memiliki dua lapisan yaitu *testa* (lapisan luar) dan *tegmen* (lapisan kulit) dan termasuk biji dikotil (Kholis, 2013).



Gambar 2.2 Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S.)
Sumber: (Kurniawan, 2015)

2.3.3 Kandungan Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, saponin, fenolik, minyak atsiri. Minyak atsiri terdiri dari glikosida, limonen, feladren, dan hedperidin (Syamsuhidayat dan Hutape, 1991). Berdasarkan penelitian dari Novita (2016) yang menyebutkan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, karbohidrat, alkaloid, dan steroid terkandung dalam daun *Citrus aurantifolia*.

2.3.4 Manfaat Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Daun Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) merupakan bagian organ tanaman jeruk nipis yang memiliki berbagai khasiat juga seringkali digunakan oleh masyarakat sebagai obat penawar penyakit hingga bahan bumbu masakan (Razak, 2013). Pada bidang kesehatan, daun jeruk nipis bermanfaat sebagai untuk mengobati diare, menambah nafsu makan, mengobati sariawan, mengobati sakit

tenggorokan, antioksidan, anti-inflamasi, antimikroba, dan antiipiuretik (Mursito, 2006). Daun jeruk nipis dapat digunakan sebagai antimikroba dalam menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri yaitu *Staphylococcus aureus* (Razak, 2013), *Staphylococcus epidermidis* (Nurdin, 2012), *Salmonella typhi* (Pratiwi, 2013), dan *Enterococcus faecalis* (Ramadhinta, 2016).

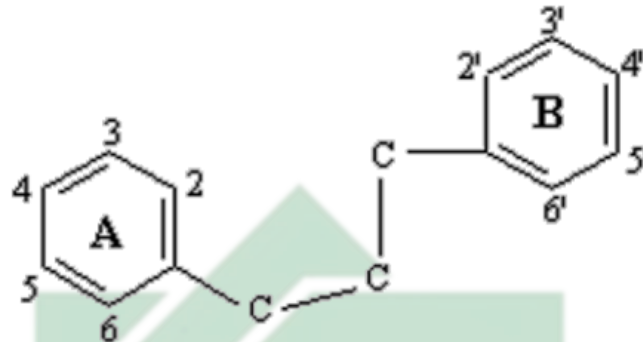
2.4 Senyawa Metabolit Sekunder

Senyawa metabolit sekunder adalah suatu molekul organik yang tidak mempunyai fungsi secara spontan dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Senyawa tersebut disintesis oleh biji, akar, bunga, buah, dan daun. Menurut Sanchez dan Demain (2019) metabolit sekunder memiliki beberapa fungsi yaitu 1) sebagai alat perlindungan diri terhadap mikroorganisme (virus, bakteri, dan jamur), tanaman kompetitor, hewan herbivora, 2) sebagai penghasil aroma, pigmen, atraktan (rasa) untuk zookori yang merupakan binatang yang memiliki kemampuan dalam menyebarkan biji, dan pollinator, 3) sebagai alat pertahanan diri dari bahaya sinar radiasi dan penyimpanan nitrogen. Senyawa metabolit sekunder meliputi flavonoid, tanin, saponin, senyawa fenolik, dan sebagainya.

2.4.1 Senyawa Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh tanaman. Jumlah senyawa flavonoid di alam sangatlah besar karena banyaknya jenis tingkat hidroksilasi, glikolisasi, dan alkoksilasi. Susunan dasar karbon senyawa flavonoid terdiri dari 15 atom C (karbon) yang terbentuk menjadi susunan C₆-C₃-C₆. Salah satu tanaman memproduksi senyawa tersebut adalah jeruk nipis. Flavonoid dihimpun dalam vakuola sel tanaman tetapi tempat sintesis flavonoid

dilakukan di luar vakuola (Julianto, 2019). Flavonoid terbentuk dari gabungan dari dua jalur biosintesis yakni jalur asam asetat mevalonat dan jalur asam asetat. Adapun struktur senyawa dari flavonoid, sebagai berikut:



Gambar 2.3 Struktur senyawa flavonoid
Sumber: Julianto, 2019

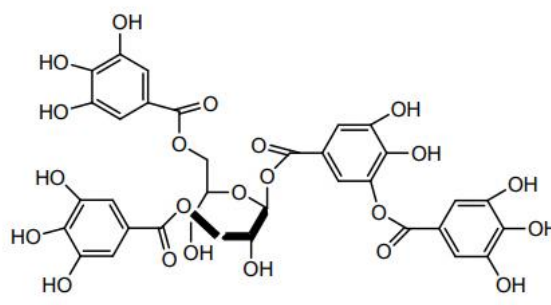
Flavonoid banyak diproduksi di dalam tanaman. Senyawa flavonoid yang berjumlah > 2000 berasal dari tanaman. Senyawa flavonoid yang ditemukan dan diidentifikasi yaitu senyawa flavonol, flavon, dan antosianin. Antosianin yaitu pigmen berwarna yang terdapat dalam tanaman umumnya pada bagian bunga berwarna ungu, biru, dan merah. Pigmen tersebut bisa diperoleh di dalam bagian organ tanaman lainnya seperti pada akar, batang, daun, serta buah-buahan tertentu (Julianto, 2019). Adapun

Flavonoid merupakan senyawa aktif dalam tanaman yang berfungsi sebagai antimikroba yaitu dengan mengganggu kinerja dari mikroorganisme seperti bakteri, virus, hingga jamur. Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antimikroba yaitu dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga mengalami kerusakan membran sel bakteri kemudian diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria, 2009). Flavonoid memiliki kemampuan dalam mengganggu fungsi dari membran sel dan menginaktifkan enzim, menghambat sintesis asam nukleat, dan mengganggu metabolisme energi.

Flavonoid dapat mengganggu pertumbuhan pada kelompok bakteri gram negatif maupun gram positif (Nuria, 2009).

2.4.2 Senyawa Tanin

Tanin adalah salah satu senyawa fenolik yang memiliki rasa kelat dan pahit. Senyawa ini mampu bereaksi dan mampu menggumpalkan protein dan senyawa organik lainnya yang mengandung alkaloid dan asam amino. Tanin berasal dari bahasa Inggris yaitu *tannin* (Julianto, 2019). Tanin memiliki struktur senyawa C6 (cincin benzena) yang berikatan dengan -OH (gugus hidroksil). Tanin mengandung banyak -OH (gugus hidroksil) juga gugus lainnya yang sesuai seperti gugus karboksil yang membentuk ikatan kompleks yang kuat dengan protein dan makromolekul lainnya. Senyawa ini dapat ditemukan di berbagai jenis tanaman. Senyawa ini memiliki peranan penting dalam melindungi tanaman dari perburuan yang dilakukan oleh hewan herbivora dan hama, juga sebagai agen pengatur dalam metabolisme tanaman. Tanin mempunyai berat molekul sekitar 500 hingga 3000 dan lebih besar dari 20.000 (Julianto, 2019). Adapun struktur senyawa dari tanin, sebagai berikut:



Gambar 2.4 Struktur senyawa tanin

Sumber: Noer, dkk., 2018

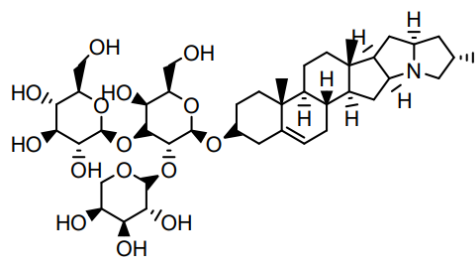
Tanin dibagi menjadi dua bentuk senyawa yaitu tanin yang terhidrolisis dan tanin yang terkondensasi. Senyawa tanin yang terhidrolisis dengan asam atau enzim yang memproduksi asam galat dan asam elagat disebut tanin terhidrolisis. Apabila tanin terhidrolisis direaksikan dengan FeCl_3 akan menghasilkan pergantian warna menjadi biru hingga hitam. Sedangkan tanin yang resisten terhadap reaksi hidrolisis dan diturunkan dari flavonol, katekin, dan flavan-3,4-diol disebut tannin terkondensasi. Apabila tanin yang terkondensasi ditambahkan asam atau enzim akan mengalami dekomposisi kemudian menjadi plobapen. Pada proses ekstraksi menggunakan metode destilasi, tannin terkondensasi berubah menjadi katekol sehingga disebut dengan tanin katekol. Tanin yang terkondensasi apabila direaksikan dengan senyawa FeCl_3 akan menghasilkan pergantian warna menjadi hijau (Julianto, 2019).

Tanin dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri untuk mengganggu aktivitas pertumbuhan bakteri. Mekanisme kerja dari tanin yaitu mendenaturasi dan mengkoagulasi protein. Senyawa ini berikatan langsung dengan protein kemudian membentuk ion H^+ dan mempengaruhi kondisi pH berganti menjadi asam yang mengakibatkan protein mengalami denaturasi (Hafsari, 2015). pH asam dapat menginaktivasi enzim sehingga menyebabkan metabolisme terganggu, terjadinya kerusakan pada sel, bahkan menyebabkan mortalitas pada sel. Tanin berperan dalam mengganggu aktivitas dari enzim *reverse transcriptase* dan DNA *topoisomerase* yang mengakibatkan sel bakteri tidak bisa dibentuk (Indarto, 2019).

2.4.3 Senyawa Saponin

Saponin adalah glikosida steroid dan triterpenoid yang secara struktural kompleks diproduksi oleh tanaman. Saponin terbentuk dari kata *Sapo* yang

memiliki arti sabun. Kata *Sapo* berasal dari Bahasa latin. Saponin mempunyai sifat surfaktan yang dapat memproduksi busa seperti sabun yang stabil ketika dikocok dalam air. Definisi lain dari saponin yaitu sekumpulan glikosida yang memiliki berat molekul tinggi yang terdiri atas bagian glikan yang terkait dengan aglikon yang biasa disebut dengan sapogenin atau genin (Julianto, 2019). Adapun struktur senyawa dari saponin, sebagai berikut:



Gambar 2.5 Struktur senyawa saponin
Sumber: Noer, dkk., 2018

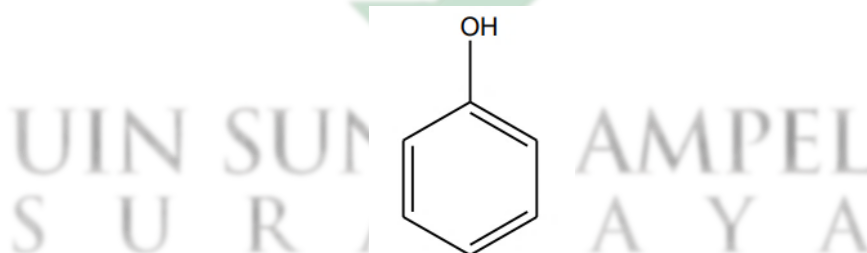
Sapogenin didefinisikan sebagai saponin triterpenoid yang memiliki atom karbon sebanyak 30, sedangkan saponin steroid memiliki atom karbon sebanyak 27. Berdasarkan kerangka karbon aglikon, saponin diklasifikasikan menjadi 12 jenis yaitu steroids, dammaranes, tirucallanes, hopanes, lupanes, ursanes, lanostanes, cucurbitanes, cycloartanes, taraxatanes, 23-nor oleananes, dan oleananes. Saponin biasanya dapat ditemukan di tanaman herba tahunan atau dua tahunan, rerumputan, semak, pohon, tanaman budidaya maupun tanaman liar (Julianto, 2019).

Kandungan saponin dalam tanaman dimanfaatkan sebagai antibakteri dalam menghambat aktivitas bakteri. Mekanisme kerja dari saponin yaitu dengan cara mendenaturasi protein, karena zat aktif pada permukaan saponin memiliki sifat yang mirip dengan deterjen sehingga saponin digunakan sebagai antibakteri yang mana tegangan permukaan dinding sel bakteri akan diturunkan dan permeabilitas

membran sel bakteri dirusak. Apabila membran sel bakteri mengalami kerusakan maka kehidupan bakteri terganggu. Selanjutnya, saponin berdifusi melalui membran sitoplasma sehingga mengganggu keseimbangan dari membran dan menyebabkan sitoplasma bocor kemudian keluar dari sel yang mengakibatkan sel mengalami mortalitas (Sudarmi, dkk., 2017).

2.4.4 Senyawa Fenolik

Fenolik merupakan suatu senyawa yang berasal dari metabolit sekunder bioaktif yang tersebar secara luas di tanaman terutama disintesis oleh $C_6H_{13}NO_3S$ (asam siklambat), jalur pentosa fosfat, dan jalur fenilpropanoid. Struktur senyawa ini terdiri dari -OH (gugus hidroksil) yang berikatan dengan cincin fenil Fenolik mencakup sejumlah senyawa lain yang mempunyai cincin aromatik dengan jumlah OH (gugus hidroksil) sebanyak satu atau dua dan dapat beragam dari molekul sederhana sampai polimer yang kompleks (Julianto, 2019). Adapun struktur senyawa dari fenolik, sebagai berikut:



Gambar 2.6 Struktur senyawa fenolik
Sumber: Purba, 2019

Senyawa fenolik ini memiliki beberapa karakteristik yaitu dapat menyerap sinar Uv-Vis, mudah terlarut dalam pelarut bersifat polar, tidak berwarna, apabila senyawa ini terkena udara maka warnanya akan berubah menjadi gelap, dapat membentuk kompleks dengan protein, peka terhadap oksidasi enzim, dan mudah teroksidasi dalam basa kuat (Julianto, 2019). Fenolik dibagi menjadi beberapa

subkelompok berdasarkan jumlah gugus fenolik hidroksil yang menempel dan elemen struktural yang menghubungkan cincin benzene, antara lain: asam fenolat, tanin, flavonoid, dan stilbene (Julianto, 2019).

Kelompok senyawa fenolik dalam tanaman memiliki beberapa kegunaan yaitu pembangun dinding sel dilakukan oleh lignin, antosianin sebagai pemberi pigmen (cyanidin, delphinidin, dan pelargonidin), pengendali pertumbuhan yaitu flavonol, fenol sederhana bertugas untuk menghambat dan merangsang perkecambahan, vanillin dan metil asetat sebagai senyawa yang memberikan aroma, serta flavonoid sebagai alat pertahanan (Julianto, 2019).

Senyawa fenolik terbagi atas dua jenis senyawa utama berdasarkan jalur biosintesisnya yaitu jalur asam asetat mevalonat dan jalur asam asetat. Senyawa poliketida merupakan senyawa yang berasal dari jalur asam asetat mevalonat, sedangkan senyawa fenil propanoid merupakan senyawa yang berasal dari jalur asam asetat. Senyawa fenil propanoid biasanya ditemukan di tanaman tingkat tinggi. Fenil propanoid terdiri dari C₆ (cincin benzene) yang terikat pada ujung rantai karbon C₃ (propana). Senyawa ini merupakan turunan dari fenil alanin. Fenil alanin ini berasal dari turunan asam amino protein aromatis. Kelompok senyawa fenil propanoid adalah kumarin, fenil propane, dan hidroksikumarin (Julianto, 2019).

Senyawa fenolik mampu menghambat pertumbuhan bakteri sehingga senyawa ini mampu menjadi antibakteri. Mekanisme kerja dari senyawa ini dengan mengubah permeabilitas dari membran sitoplasma kemudian mengakibatkan kebocoran zat intraseluler. Senyawa ini juga mampu menginaktifkan dan

mendenaturasi protein. Protein yang biasanya didenaturasi dan dinaktifkan adalah enzim (Nurmilah, 2009).

2.5 Ekstraksi

2.5.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu teknik yang bermanfaat untuk memisahkan kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam bahan alam seperti hewan ataupun tumbuhan menggunakan pelarut yang sesuai dengan standar prosedur ekstraksi (Sudarwati dan Fernanda, 2019). Ekstraksi adalah suatu proses memisahkan zat dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Proses ekstraksi akan dilakukan pemberhentian apabila telah mencapai kesetimbangan konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tumbuhan. Setelah ekstraksi, sampel dan pelarut dipisahkan menggunakan penyaringan. (Mukhriani, 2014).

Mekanisme ekstraksi pada bahan yang diambil dari tanaman, sebagai berikut: 1) Pengolompokkan bagian tanaman (bunga, daun, akar, sari buah, batang, kulit buah, dan lain – lain), 2) Pengeringan bagian tanaman yang dipakai, 3) Penggilingan bagian tanaman yang sudah dikeringkan, 4) Pemilihan pelarut yang disesuaikan dengan sifat zat terlarut (Mukhriani, 2014). Berdasarkan sifatnya, pelarut dibedakan menjadi tiga macam yaitu pelarut bersifat polar seperti air, etanol, methanol, dan lain – lain; pelarut bersifat semipolar seperti etil asetat, diklorometan, dan lain – lain; dan pelarut bersifat nonpolar seperti n – heksana, kloroform, petroleum, dan lain -lain (Mukhriani, 2014).

2.5.2 Jenis-jenis Ekstraksi

Ekstraksi bisa dilakukan menggunakan beberapa metode baik cara dingin maupun cara panas, sebagai berikut:

a. Maserasi

Maserasi adalah suatu ekstraksi dengan cara dingin dan dapat dilakukan dengan memasukkan serbuk dari tanaman kemudian dilarutkan menggunakan pelarut yang sesuai ke dalam tempat inert yang tertutup rapat dan diletakkan pada suhu ruangan. Metode ini merupakan salah satu metode ekstraksi yang paling mudah dan sering digunakan serta termasuk metode ekstraksi cara dingin. Proses maserasi dikatakan selesai, jika proses ekstraksi telah mencapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa aktif dan konsentrasi yang terdapat pada sel tanaman, selanjutnya dipisahkan dari sampel menggunakan filtrasi (Mukhriani, 2014).

Kerugian dari metode maserasi yaitu durasi waktu yang dibutuhkan relatif lama, pelarut yang dibutuhkan cukup banyak, terdapat beberapa senyawa yang sukar diekstraksi pada kondisi suhu kamar, dan kemungkinan besar ada beberapa senyawa yang hilang. Sedangkan, keuntungan dari metode maserasi yaitu mampu terhindar dari kerusakan senyawa yang memiliki sifat termolabil (Mukhriani, 2014).

b. Perkolasi

Perkolasi yaitu salah satu metode ekstraksi cara dingin yang prosesnya dengan cara melewatkan serbuk sampel dibasahi secara lambat dalam wadah berbentuk silinder pada bagian bawahnya terdapat kran atau dikenal dengan sebutan percolator. Pelarut dimasukkan pada bagian atas dari serbuk sampel kemudian dibiarkan menetes secara perlahan di bagian bawah. Perkolasi memiliki kelemahan

yaitu jika sampel yang berada di dalam perkolator tidak homogen, maka pelarut akan mengalami kesulitan untuk menjangkau seluruh daerah, waktu yang dibutuhkan relatif lama juga menggunakan zat pelarut yang relatif banyak. Sedangkan, kelebihan dari perkolasi adalah sampel dialiri dengan pelarut yang selalu baru (Mukhriani, 2014).

c. Reflux dan Destilasi Uap

Reflux merupakan salah satu metode ekstraksi dengan mensintesis senyawa anorganik. Metode ini digunakan jika pelarut yang digunakan volatile. Selama pemanasan, pelarut akan menguap sebelum reaksi berjalan hingga selesai. Prinsip kerja dari metode ini yaitu pelarut volatil akan menguap pada temperature tinggi, tetapi pelarut volatile akan didinginkan menggunakan kondensor. Tujuan dari proses ini adalah uap yang dihasilkan akan diubah menjadi embun kemudian diturunkan ke dalam wadah reaksi sehingga pelarut tetap ada selama pereaksian berlangsung. Aliran gas dinitrogen ditambahkan bertujuan untuk mencegah penguapan air atau gas O_2 masuk ke dalam senyawa organologam untuk dilakukan sintesis senyawa anorganik yang bersifat reaktif (Mukhriani, 2014).

Reflux dan destilasi uap memiliki persamaan pada proses kerjanya. Proses kerja dari kedua metode adalah sampel ditambahkan bersama dengan pelarut ke dalam labu yang dihubungkan langsung dengan kondensor. pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih yang disesuaikan dengan jenis pelarut yang digunakan. Uap yang terkondensasi kemudian kembali ke dalam labu. Selama proses pemanasan, uap yang terkondensasi dan destilat (larutan terpisah sebagai dua bagian yang tidak saling tercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung

langsung dengan kondensor. Adapun kerugian dari reflux dan destilasi uap yaitu senyawanya bersifat termolabil dan mudah terdegradasi. Destilasi uap digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial. Minyak esensial berasal dari campuran dari berbagai senyawa yang menguap (Mukhriani, 2014).

d. Soxhlet

Soxhlet merupakan salah satu ekstraksi dengan cara panas. Metode ini juga sering digunakan dalam ekstraksi. Mekanisme kerja dari metode ini adalah dengan menempatkan serbuk sampel ke dalam kertas saring yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. pelarut yang digunakan yang sesuai dengan jenis serbuk sampelnya kemudian dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangasnya diset di bawah suhu reflux (Mukhriani, 2014).

Kelemahan dari metode ini adalah senyawa yang dihasilkan bersifat termolabil, senyawanya dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh secara terus menerus berada pada titik didih, sedangkan, kelebihan dari metode ini adalah proses ekstraksinya dilakukan secara kontinyu, sampel terekstraksi dengan pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak memerlukan pelarut yang banyak, dan efisiensi waktu yang cukup baik (Mukhriani, 2014).

2.6 Antibakteri

2.6.1 Definisi Antibakteri

Antibakteri yaitu suatu zat yang mampu menghambat pertumbuhan atau dapat membunuh bakteri dengan mengganggu metabolisme bakteri. Antibakteri bisa digunakan apabila memiliki sifat dapat mematikan bakteri yang menyebabkan infeksi atau penyakit namun tidak toksik (beracun) bagi penderitanya. Adapun faktor-faktor yang dapat mengganggu aktivitas antibakteri yaitu suhu, pH, waktu

inkubasi, dan jumlah bahan yang ada. Zat aktif seperti senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam berbagai macam tanaman dapat diketahui bahwa zat atau senyawa tersebut mampu menghambat pertumbuhan hingga mematikan bakteri patogen (Madigan, et. al., 2000).

2.6.2 Sifat Antibakteri

Antibakteri memiliki tiga sifat menurut Madigan, et al. (2000) yaitu:

- a. Bakteriostatik adalah sifat antibakteri yang berperan untuk menghambat pertumbuhan bakteri namun tidak mematikan. Bakteriostatika sering menghambat sintesis protein. Hal ini terjadi ketika zat antibakteri ditambahkan dalam kultur bakteri yang berada di fase logaritmik. Setelah ditambahkan zat antibakteri saat fase logaritmik diperoleh jumlah sel keseluruhan maupun jumlah sel hidup adalah konstan.
- b. Bakteriosidal adalah sifat antibakteri yang berperan untuk membunuh sel tetapi selnya tidak mengalami lisis atau pecah. Hal ini terjadi ketika zat antibakteri ditambahkan pada kultur bakteri yang berada fase logaritmik. Setelah ditambahkan zat antibakteri pada fase logaritmik diperoleh hasil jumlah sel keseluruhan konstan tetapi jumlah sel hidup mengalami penurunan.
- c. Bakteriolitik adalah sifat antibakteri yang berperan untuk melisiskan atau memecahkan sel atau mengalami kekeruhan setelah ditambahkan zat antibakteri. Hal ini terjadi ketika zat antibakteri ditambahkan pada kultur bakteri yang berada pada fase logaritmik. Setelah ditambahkan zat antibakteri pada fase logaritmik diperoleh jumlah sel keseluruhan maupun jumlah sel mengalami penurunan.

2.6.3 Mekanisme Kerja Antibakteri

a. Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel

Antibakteri yang dapat merusak lapisan peptidoglikan yang menyusun dinding sel dari bakteri gram negatif dan gram positif. Mekanisme kerja dari antibakteri ini adalah mencegah ikatan silang lapisan peptidoglikan dalam tahap akhir dari proses sintesis dinding sel yaitu dengan menghambat *penicillin binding protein*. *Penicillin binding protein* merupakan enzim yang berada di dalam membrane plasma sel yang terlibat dalam penambahan asam amino yang berikatan silang dengan lapisan peptidoglikan pada dinding sel bakteri, kemudian memblokir kerja enzim transpeptidase yang membungkus ikatan silang polimer pada gula yang membentuk dinding sel sehingga menyebabkan dinding sel mengalami lisis (Pratiwi, 2008).

b. Antibakteri yang merusak membran sel

Antibakteri ini bekerja dengan meningkatkan permeabilitas yang menyebabkan kebocoran senyawa intraseluler. Membran plasma bersifat semipermeable yang berfungsi untuk mengontrol transport aktif berbagai metabolit ke dalam dan luar sel. Apabila ada gangguan hingga kerusakan pada susunan membran plasma maka dapat menghambat membrane plasma sebagai *osmotic barrier* (penghalang osmosis) dan mengganggu biosintesis dalam membran (Pratiwi, 2008).

c. Antibakteri yang mempengaruhi metabolisme asam nukleat

Antibakteri ini menghambat sintesis asam nukleat pada tahap transkripsi dan replikasi bakteri.

d. Antibakteri yang mengganggu fungsi ribosom

Antibakteri yang menghambat proses sintesis protein dan bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri namun tidak mematikan).

e. Antibakteri sebagai antimetabolit

Antimetabolit merupakan substansi yang secara kompetitif dapat menghambat proses metabolisme suatu bakteri. Hal ini dikarenakan strukturnya mirip dengan substrat normal bagi enzim metabolisme.

2.6.4 Faktor yang Mempengaruhi Antibakteri

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri menurut lestari (2016) antara lain:

a. Jumlah Mikroorganisme

Apabila populasi dari bakteri tersebut banyak maka waktu yang dibutuhkan untuk menghambat bakteri akan membutuhkan waktu yang lebih lama.

b. Jenis Mikroorganisme

Jenis mikroorganisme menunjukkan tingkat kerentanan yang berbeda-beda terhadap setiap perlakuan yang diberikan baik secara fisik maupun dengan zat/bahan kimia.

c. Konsentrasi Ekstrak

Peluang keefektifan menghambat atau membunuh bakteri sebanding dengan jumlah bakteri dan konsentrasi zat antibakteri. Dengan demikian, semakin tinggi konsentrasi zat antibakteri (sampai batas tertentu) maka bakteri akan terbunuh relatif lebih cepat dan nilai daya hambat lebih besar.

d. Suhu

Terjadinya kenaikan suhu yang sedar secara besar dapat meningkatkan efektifitas dari suatu desinfektan atau zat antibakteri lain. hal ini dikarenakan adanya laju reaksi kimiawi yang dipercepat dengan cara menaikkan suhu.

e. Kondisi pH

Bakteri yang hidup pada bahan dengan kondisi pH asam dapat dibasmi pada suhu yang lebih rendah dan dalam kurun waktu yang relative singkat dibandingkan dengan bakteri yang sama tetapi dalam kondisi lingkungan dengan pH basa.

f. Bahan Organik

Bahan organik asing mampu menurunkan efektifitas dari suatu zat kimia antibakteri dengan menginaktifkan bahan-bahan tersebut maupun melindungi bakteri dari zat antibakteri.

2.7 Metode Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian uji aktivitas antibakteri adalah metode yang digunakan untuk menentukan level kerentanan bakteri terhadap antibakteri juga untuk mengetahui senyawa murni pada ekstrak tanaman yang mempunyai aktivitas antibakteri. Tujuan dari uji aktivitas antibakteri yaitu untuk mengetahui potensi suatu zat yang

diduga peranan dalam uji aktivitas sebagai antibakteri dalam suatu larutan terhadap bakteri patogen. Aktivitas antibakteri biasanya dilakukan secara *in vitro*. Metode uji ini terbagi atas dua metode yaitu metode difusi dan metode dilusi.

2.7.1 Metode Difusi

Metode difusi merupakan metode uji antibakteri yang telah dikembangkan sejak tahun 1940. Metode ini banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi klinis yang digunakan untuk menguji kerentanan antibakteri secara kontinu. Definisi dari metode difusi adalah suatu metode yang digunakan untuk menentukan tingkat sensitivitas bakteri uji terhadap zat antibakteri (Balouri, et.al., 2016). Sensitivitas bakteri yaitu kepekaan suatu bakteri terhadap pemberian antibiotik terhadap bakteri patogen. Keuntungan menggunakan metode difusi sebagai berikut:

- a. Praktis karena tidak menggunakan peralatan khusus dan mencakup fleksibilitas yang lebih besar dalam memilih obat yang akan diperiksa (Fitriana, dkk., 2019).
- b. Mampu bekerja menggunakan suatu inhibitor tertentu (Jawetz et al., 1996).
- c. Mampu membentuk suatu gradien konsentrasi senyawa antimikroba (Jawetz et al., 1996).

Pengujian uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dilakukan dengan *paper disc* (kertas cakram). Prinsip kerja dari metode ini yaitu media agar yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji kemudian diletakkan *paper disc* yang sudah direndam dalam larutan senyawa uji pada permukaan atas media. Selanjutnya, diinkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, diamati daerah hambatan yang terbentuk disekeliling *paper disc* (Fitriana, dkk., 2019). Metode

difusi dibedakan menjadi tiga jenis yaitu metode kertas cakram, metode silinder, dan metode sumuran sebagai berikut:

a. Metode Kertas Cakram

Metode difusi kertas cakram merupakan metode yang paling sering digunakan dalam penelitian mengenai uji aktivitas antibakteri. Metode difusi kertas cakram adalah suatu zat antibakteri yang akan diuji direndam pada kertas cakram dan diletakkan pada media agar padat yang sudah dihomogenkan terlebih dahulu dengan bakteri uji. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dan diamati zona hambat yang terbentuk disekeliling kertas cakram (Novita, 2016).

Menurut Davis dan Stout (1971) menyatakan bahwa ada empat kriteria untuk mengetahui kekuatan daya antibakteri dapat dilihat pada tabel 2.1 berikut:

Tabel 2.1 Kriteria Daya Antibakteri

No	Diameter Zona Hambat (mm)	Daya Antibakteri
1	< 5	Lemah
2	5-10	Sedang
3	10-20	Kuat
4	>20	Sangat kuat

(Dokumentasi pribadi, 2021)

b. Metode Silinder

Metode difusi silinder adalah suatu metode yang memiliki prinsip kerja dengan meletakkan beberapa silinder yang dapat terbuat dari besi tahan karat maupun gelas di atas media agar yang sudah diinokulasikan dengan bakteri uji. Setiap silinder diletakkan dengan posisi berdiri di atas media agar, selanjutnya silinder tersebut diisi dengan larutan senyawa antibakteri yang akan diuji dan diinkubasi. Selesai diinkubasi, pertumbuhan bakteri dilihat apakah ada atau tidaknya area hambatan yang terbentuk di sekitar silinder (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

c. Metode Sumuran

Metode difusi sumuran adalah suatu metode yang dilakukan dengan membuat sumuran pada media agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Jumlah dan letak sumuran disesuaikan dengan penelitian, selanjutnya sumuran diinjeksikan ekstrak tanaman yang akan diuji. Kemudian, suhu 37°C selama 18-24 jam dan dilanjutkan dengan mengamati pertumbuhan bakteri yang bertujuan untuk melihat ada atau tidak hambatan di sekeliling lubang. Kelebihan dari metode ini adalah media agar padat yang digunakan terlalu tebal tetapi kekurangan menggunakan metode ini adalah sumuran yang dibuat ini kurang sempurna bentuknya (Kusmayati dan Agustini, 2007).

2.7.2 Metode Dilusi

Metode dilusi adalah suatu cara yang digunakan untuk menentukan konsentrasi minimum dari suatu zat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme kerja dari metode ini yaitu dengan cara mencampurkan zat pada media pembenihan yang kemudian diinokulasikan dengan bakteri lalu diinkubasi. Hasil pengujian dilusi didapatkan dengan mengamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada media. Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu metode dilusi padat dan metode dilusi cair (Pratiwi, 2008).

a. Metode Dilusi Padat

Metode dilusi padat merupakan suatu metode pengujian aktivitas antibakteri yang menggunakan media padat (*solid*). Metode ini digunakan untuk mengukur nilai KHM dan KBM. Kelebihan dari metode dilusi padat yaitu satu konsentrasi agen antibakteri yang diuji bisa digunakan untuk menguji bakteri uji (Pratiwi, 2008).

Prinsip kerja dari metode dilusi padat yaitu membuat seri pengenceran agen antibakteri pada media padat yang ditambahkan dengan bakteri uji. Larutan uji agen antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih dan tidak ada pertumbuhan bakteri uji dapat ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM selanjutnya akan dikultur ulang pada media padat tanpa ditambahkan bakteri uji maupun agen antibakteri dan diinkubasi pada suhu ruang 18-24 jam. Media padat yang masih tetap terlihat jernih setelah melewati proses inkubasi dapat ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi, 2008).

b. Metode Dilusi Cair

Metode dilusi cair merupakan suatu metode pengujian aktivitas antibakteri yang menggunakan media cair (*broth*). Metode ini digunakan untuk mengukur nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Prinsip kerja dari metode dilusi cair yaitu membuat seri pengenceran agen antibakteri pada media cair yang ditambahkan dengan bakteri uji. Larutan uji agen antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih dan tidak ada pertumbuhan bakteri uji dapat ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM kemudian akan dikultur ulang pada media cair tanpa ditambahkan bakteri uji maupun agen antibakteri dan diinkubasi pada suhu ruang 18-24 jam. Media cair yang masih tetap terlihat jernih setelah melewati proses inkubasi dapat ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi, 2008).

2.8 Sterilisasi

Sterilisasi dalam penelitian memiliki peran penting untuk mendukung kelancaran hasil kultur dan menjaga kebersihan suatu benda yang akan dipakai sehingga terhindar dari kontaminasi. Adapun pengertian dari sterilisasi adalah suatu

metode yang digunakan untuk menghilangkan jenis mikroorganisme yang hidup pada benda di sekitar seperti fungi, protozoa, bakteri, virus, dan mycoplasma sehingga benda tetap steril serta mencegah adanya kontaminan pada benda (Istini, 2020). Selain itu, menurut Fardiaz (1992) sterilisasi yaitu suatu cara yang digunakan untuk mematikan mikroorganisme yang ada dan apabila ditumbuhkan pada media tidak ada mikroorganisme yang ikut tumbuh dan berkembang biak. Tujuan dari sterilisasi yaitu harus mampu membunuh mikroorganisme yang sangat tahan panas seperti spora bakteri.

Sterilisasi dibedakan menjadi tiga jenis yaitu sterilisasi secara kimia, sterilisasi secara fisika, dan sterilisasi secara mekanik sebagai berikut:

a. Sterilisasi Kimia

Sterilisasi kimia biasanya menggunakan cairan desinfektan seperti alkohol. Sterilisasi kimia juga dapat memakai antiseptik kimia yang biasanya digunakan dan dibiarkan menguap seperti pada alkohol. Umumnya, proses antiseptik kimia dilakukan secara langsung dengan memberikan pada peralatan atau media yang akan disterilkan. Pemilihan jenis antiseptik biasanya tergantung pada penggunaan dari tujuan tertentu juga efek yang diinginkan.

b. Sterilisasi Fisika

Sterilisasi fisika merupakan salah satu metode sterilisasi yang paling sering digunakan. Sterilisasi fisika dibedakan menjadi tiga jenis yaitu sterilisasi fisik dengan cara pemanasan kering, pemanasan basah, dan pemijaran, sebagai berikut:

1. Sterilisasi dengan Pemanasan Kering

Cara pemanasan kering biasanya menggunakan oven. Prinsip kerja sterilisasi menggunakan oven yaitu alat-alat yang akan disterilkan di oven pada suhu 160-

170°C selama 1-2 jam. Sterilisasi pemanasan kering cocok untuk sterilisasi serbuk yang tidak stabil terhadap uap air, alat yang terbuat dari kaca seperti erlemeyer, tabung reaksi, dan sebagainya (Tille, 2017).

2. Sterilisasi dengan cara Pemanasan Basah

Cara pemanasan basah hampir mirip dengan teknik pengukusan. Pemanasan basah dilakukan menggunakan autoklaf dengan memanfaatkan uap panas pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Proses sterilisasi ini paling sering digunakan karena aman, cepat, dan lebih efisien. Selain itu sterilisasi menggunakan cara ini mampu mematikan mikroorganisme karena uap panas dapat menyebabkan denaturasi protein dan termasuk enzim-enzim yang terdapat di dalam sel (Tille, 2017).

3. Sterilisasi dengan cara Pemijaran

Sterilisasi pemijaran yaitu sutau kegiatan dengan membakar alat-alat secara langsung di atas api bunsen. Alat-alat biasanya yang disterilisasi dengan proses ini contohnya ujung pinset, ujung jarum ose, uji spatula yang berbahan dasar logam. Sterilisasi pemijaran dilakukan hingga alat-alat tersebut berubah warna menjadi merah pijar (Fauzi, et al., 2014).

c. Sterilisasi Mekanik

Sterilisasi mekanik biasa disebut dengan filtrasi. Sterilisasi jenis ini menggunakan suatu saringan yang memiliki pori sangat kecil dengan ukuran 0,22 atau 0,45 mikron sehingga bakteri tertahan pada saringan. Sterilisasi ini ditujukan untuk sterilisasi bahan yang peka terhadap panas seperti larutan serum, ekstrak sel, enzim, toksik kuman, dan sebagainya (Fauzi, et al., 2014).

2.9 Media

Media adalah suatu wadah untuk menumbuhkan bakteri yang terbuat dari campuran berbagai nutrisi. Adapun persyaratan dalam pembuatan media supaya dapat menumbuhkan bakteri dengan baik yaitu 1) pH harus sesuai, 2) kadar oksigen tercukupi, 3) media diinkubasi pada suhu tertentu, 4) kelembapan harus sesuai, 5) media pembedahan harus dalam kondisi steril, 6) media tidak mengandung kontaminan, 7) media harus mengandung semua nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme.

Cappucino (2014) menyatakan kandungan nutrisi dalam media yang dibutuhkan oleh mikroorganisme dalam pertumbuhannya terdiri atas unsur non logam dan unsur logam. Unsur non logam terdiri atas sulfur dan fosfor, sedangkan unsur logam terdiri atas Ca, Na, K, Cu, Zn, Mg, Mn, vitamin, H₂O₂, dan energi. Adapun jenis-jenis media menurut Dwidjoseputro (2005) yaitu media yang diperkaya, media sintetik, media kering, media padat, dan media cair. Berbeda dengan Benson (2002) yang menyebutkan macam-macam media terdiri dari media padat, media semi padat, dan media cair.

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah kuantitatif dengan metode eksperimental. Metode eksperimental yaitu suatu jenis penelitian kuantitatif yang mengukur hubungan sebab-akibat dengan membandingkan dampak dari variasi variabel bebas terhadap variabel terikat kemudian dari hasil penelitian tersebut dilakukan analisis data (Rosjidi, 2007). Pada penelitian uji antibakteri ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dimana data yang telah dikumpulkan selanjutnya digunakan untuk mengetahui zona hambat terhadap *Propionibacterium acnes* dengan media antibakteri alami yaitu hasil ekstrak etanol daun jeruk nipis 100% yang diencerkan pada konsentrasi 5%, 10%, 15%, 25%, 35%, 50%, 70%, dan 100%. Penentuan zona hambat dilakukan dengan proses metode difusi.

Penelitian ini uji difusi dilakukan secara bersamaan pada delapan kelompok perlakuan sesuai dengan konsentrasi (5%, 10%, 15%, 20%, 35%, 50%, 70%, dan 100%) dan dua kelompok perlakuan kontrol yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Jumlah sampel dari setiap kelompok perlakuan dihitung dengan menggunakan rumus Federer. Rumus Federer: $(n - 1)(t - 1) \geq 15$. n adalah jumlah sampel dan t adalah jumlah kelompok (Andries, 2009). Perhitungan jumlah sampel tiap kelompok sebagai berikut:

$$(n - 1)(10 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1)(9) \geq 15$$

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 15 + 9$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,66 = 3$$

Berdasarkan hasil perhitungan, maka jumlah perlakuan sebanyak 10 dengan 3 kali pengulangan pada setiap konsentrasi. Perlakuan uji antibakteri menggunakan metode difusi pada ekstrak daun jeruk nipis terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* terdiri dari 8 variasi konsentrasi dan 2 perlakuan kontrol, sebagai berikut:

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| P1 : Ekstrak daun jeruk nipis 5% | P6 : Ekstrak daun jeruk nipis 50% |
| P2 : Ekstrak daun jeruk nipis 10% | P7 : Ekstrak daun jeruk nipis 70% |
| P3 : Ekstrak daun jeruk nipis 15% | P8 : Ekstrak daun jeruk nipis 100% |
| P4 : Ekstrak daun jeruk nipis 25% | P9 : Tetrasiklin 0,15% (Kontrol +) |
| P5 : Ekstrak daun jeruk nipis 35% | P10: DMSO 5% (Kontrol -) |

Pada pengukuran konsentrasi hambat minimum dan konsentrasi bunuh minimum menggunakan metode dilusi. Penggunaan konsentrasi pada uji ini diambil dari hasil diameter zona hambat yang terbaik kemudian dilakukan pengenceran bertingkat yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%. Setelah itu, dilakukan pengukuran nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Variasi konsentrasi pada uji KHM dan KBM dapat dilihat sebagai berikut:

- | | |
|-------------------------------------|--|
| D1 : Ekstrak daun jeruk nipis 100% | D6 : Ekstrak daun jeruk nipis 3,125% |
| D2 : Ekstrak daun jeruk nipis 50% | D7 : Ekstrak daun jeruk nipis 1,56% |
| D3 : Ekstrak daun jeruk nipis 25% | D8 : Ekstrak daun jeruk nipis 0,78% |
| D4 : Ekstrak daun jeruk nipis 12,5% | D9 : Ekstrak daun jeruk nipis 4 ml (K+) |
| D5 : Ekstrak daun jeruk nipis 6,25% | D10: Larutan suspensi <i>P. acnes</i> (K-) |

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Juni 2022 di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Kimia dasar Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya. Adapun jadwal pelaksanaan kegiatan penelitian, sebagai berikut:

Tabel 3.1 Jadwal Pelaksanaan Kegiatan Penelitian

No	Kegiatan	Bulan								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Pengajuan judul skripsi	■								
2	Penyusunan proposal skripsi		■	■						
3	Seminar proposal skripsi			■						
4	Persiapan alat dan bahan				■					
5	Pengamatan dan pengumpulan data di laboratorium				■	■	■			
6	Analisis data					■	■			
7	Penyusunan skripsi						■	■	■	
8	Seminar hasil skripsi									■

(Dokumen Pribadi, 2021)

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, blender, oven, gelas kimia, batang pengaduk, corong, *Rotary evaporator*, kain saring, autoklaf, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, labu ukur, vortex, erlemeyer, *magnetic stirrer*, gelas beaker, kertas saring whatman, ayakan, kompor listrik, gelas arloji, spatula, mikropipet, jarum ose, cawan petri, *Laminar Air Flow*, jangka sorong, sumuran, mikropipet 0 μ l – 200 μ l, mikropipet 100 μ l – 1000 μ l,

inkubator, kertas cakram, spektrofotometer UV-Vis, *aluminium foil*, *plastic wrap*, pipet tetes, pinset, toples kaca, mikrotip kuning, mikrotip biru, dan bunsen.

3.3.2 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.), biakan murni bakteri *Propionibacterium acnes*, etanol 96%, alkohol 70%, medium NA (*Nutrient Agar*), medium MHA (*Mueller Hinton Agar*), medium MHB (*Mueller Hinton Broth*), akuades steril, air fisiologis, larutan standar Mc. Farland, magnesium 0,1 mg, metanol, HCl 1N, dan FeCl₃ 1%, antibiotik tetrasiklin 0,15%, Na₂CO₃, serbuk kuersetin, serbuk asam galat, reagen Folin-Ciocalteu dan DMSO 5%.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu diameter zona hambat, konsentrasi hambat minimum (KHM), dan konsentrasi bunuh minimum (KBM).

3.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak etanol daun jeruk nipis.

3.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini yaitu jenis media tumbuh dan media uji bakteri *Propionibacterium acnes*, volume media tumbuh bakteri *Propionibacterium acnes*, jumlah inoculum *Propionibacterium acnes*, pelarut ekstraksi, waktu dan suhu inkubasi,

3.5 Prosedur Kerja Penelitian

3.5.1 Pengumpulan Sampel

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Bagian pada tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang dimanfaatkan dalam penelitian ini adalah daunnya yang memiliki daun utuh dengan kondisi yang baik. Pada daun jeruk nipis dilakukan uji determinasi dan diidentifikasi di UPTLH Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur.

3.5.2 Preparasi Sampel

Daun jeruk nipis sebanyak 2 kg disortir dengan tujuan untuk mendapatkan daun yang utuh dan bagus. Daun jeruk nipis dipotong menjadi potongan kecil-kecil. Daun jeruk nipis dicuci hingga bersih dengan air mengalir kemudian daun dikering-anginkan. Setelah itu daun dioven dengan suhu 40°C hingga kering selama 2 hari. Setelah daun mengering, tahap selanjutnya daun diangkat dari dalam oven dan dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk simplisia daun jeruk nipis yang homogen. Setelah dihaluskan, serbuk daun jeruk nipis diayak.

3.5.3 Ekstraksi Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Serbuk daun jeruk nipis diekstraksi dengan cara maserasi dalam etanol 96% menggunakan perbandingan 1:10 artinya simplisia (serbuk daun jeruk nipis):pelarut etanol 96%. Serbuk daun jeruk nipis ditimbang 200 gram dan ditambahkan 2000 ml etanol 96% dalam wadah kaca yang ditutup rapat kemudian dimaserasi selama 48 jam lalu dilakukan pengadukan setiap hari. Setelah 48 jam, filtrat dan residu dari ekstrak daun jeruk nipis disaring menggunakan corong dan kertas saring whatman larutan tersebut disaring dengan kertas saring. Setelah itu, dilakukan remaserasi

selema 24 jam. Filtrat yang dihasilkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga menjadi ekstrak etanol daun jeruk nipis yang kental dengan konsentrasi 100%. Hasil rendemen ekstrak kental daun jeruk nipis dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Jumlah berat ekstrak kental (g)}}{\text{Jumlah berat kering (g)}} \times 100\% \text{ (Senduk et al., 2020)}$$

3.5.4 Uji Skrining Fitokimia Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Secara Kualitatif

a. Uji Flavonoid

Pengujian senyawa flavonoid dilakukan dengan ditambahkan ekstrak daun jeruk nipis sebanyak 30 mg ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 0,5 mg serbuk logam Mg (magnesium) dan beberapa tetes HCl pekat. Apabila terjadi perubahan warna menjadi kuning, jingga, atau merah maka ekstrak tersebut positif mengandung senyawa flavonoid (Rini et al., 2020).

b. Uji Tanin

Pengujian senyawa tanin yaitu dengan ditambahkan ekstrak daun jeruk nipis sebanyak 20 mg kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditetesi dengan FeCl₃ sebanyak 10 tetes hingga mengalami perubahan warna. Ekstrak yang mengandung senyawa tanin ditandai dengan munculnya warna hijau kehitaman atau wana biru kehitaman (Kumalasari dan Funsu, 2020).

c. Uji Saponin

Pengujian senyawa saponin diawali dengan ditambahkan ekstrak daun jeruk nipis sebanyak 20 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan

akuades sebanyak 2 ml lalu dikocok hingga homogen. Setelah dikocok, selama 2-3 detik secara kuat, kemudian dilihat ada tidaknya busa atau buih. Apabila ekstrak menunjukkan adanya busa atau buih, maka ekstrak tersebut mengandung senyawa saponin. Sebaliknya, apabila ekstrak menunjukkan tidak adanya busa atau buih, maka ekstrak tersebut tidak mengandung senyawa saponin (Kumalasari dan Funsu, 2020).

d. Uji Fenolik

Ekstrak daun jeruk nipis sebanyak 50 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 3-4 tetes FeCl_3 1% hingga terlihat perubahan warna hitam kebiruan hingga hitam pekat. Perubahan warna inilah yang menunjukkan adanya senyawa fenolik (Ningsih, dkk., 2020).

3.5.5 Uji Skrining Fitokimia Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Secara Kuantitatif

a. Kadar Total Flavonoid

1. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Serbuk baku standar kuersetin ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan metanol sampai mencapai ambang batas labu ukur sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, dibuat seri konsentrasi larutan baku standar kuersetin yaitu 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Setelah itu, pada masing-masing konsentrasi diambil 1 ml kemudian ditambahkan 3 ml metanol, 0,2 ml AlCl_3 10%, 0,2 ml kalium asetat 1 M, dan dicukupkan dengan akuades sebanyak 5,6 ml lalu dihomogenkan dengan vortex.

Masing-masing konsentrasi larutan baku kuersetin tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan. Setelah diinkubasi, larutan standar kuersetin diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Purnamasari, et al., 2022).

2. Penetapan Kadar Total Flavonoid

Ekstrak daun jeruk nipis ditimbang sebanyak 10 mg kemudian ditambahkan 10 ml metanol. Larutan ekstrak daun jeruk nipis diambil 1 ml dari larutan stok. Selanjutnya, ditambahkan dengan 0,2 ml $AlCl_3$ 10% dan 0,2 ml kalium asetat 1 M, lalu dicukupkan dengan akuades hingga ambang batas labu ukur 10 ml kemudian dihomogenkan dengan vortex. Larutan ekstrak daun jeruk nipis yang telah diberi perlakuan akan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, larutan baku standar kuersetin diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum. Flavonoid total dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier yaitu $y=a+bx$ menjadi $x = \frac{(y-a)}{b}$ yang diperoleh dari kurva kalibrasi larutan baku standar kuersetin yang telah diukur nilai absorbansinya sebelumnya. Setelah itu, dilakukan perhitungan kadar total flavonoid menggunakan rumus, sebagai berikut

$$Kadar\ Total\ Flavonoid = \frac{V\ (ml) \times X\ (mg/ml)}{M\ (gr)} \dots \text{(Ningsih, dkk., 2020)}$$

Pada rumus tersebut V merupakan volume ekstrak, X merupakan konsentrasi flavonoid dalam ekstrak, dan M merupakan berat ekstrak kemudian hasil kadar total flavonoid dinyatakan dengan satuan mg QE/g (Purnamasari, et al., 2022).

a. Kadar Total Fenolik

1. Pembuatan Larutan Standar Asam Gallat

Serbuk baku standar asam gallat ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol 96% sampai mencapai ambang batas labu ukur sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, dibuat seri konsentrasi larutan baku standar kuersetin yaitu 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Setelah itu, pada masing-masing konsentrasi diambil 1 ml kemudian ditambahkan 3 ml etanol 96% dan 0,4 ml reagen Folin-Ciocalteu dihomogenkan lalu didiamkan selama 8 menit. Selanjutnya, ditambahkan 4 ml natrium karbonat (Na_2CO_3) 7%, dan dicukupkan dengan akuades hingga ambang batas labu ukur 10 ml lalu dihomogenkan dengan vortex. Masing-masing konsentrasi larutan baku asam gallat tersebut diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan. Setelah diinkubasi, larutan baku standar asam gallat diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Mukhriani, et al., 2019).

2. Penetapan Kadar Total Fenolik

Ekstrak daun jeruk nipis ditimbang sebanyak 10 mg kemudian ditambahkan 10 ml etanol 96%. Larutan ekstrak daun jeruk nipis diambil 1 ml dari larutan stok. Kemudian ditambahkan 3 ml etanol 96% dan 0,4 ml reagen Folin-Ciocalteu dihomogenkan lalu didiamkan selama 8 menit. Selanjutnya, ditambahkan 4 ml natrium karbonat (Na_2CO_3) 7%, dan dicukupkan dengan akuades hingga ambang batas labu ukur 10 ml lalu

dihomogenkan dengan vortex. Setelah diinkubasi, larutan baku standar asam gallat diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum. Fenolik total dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier yaitu $y=a+bx$ menjadi $x = \frac{(y-a)}{b}$ yang diperoleh dari kurva kalibrasi larutan baku standar asam gallat yang telah diukur nilai absorbansinya sebelumnya. Setelah itu, dilakukan perhitungan kadar total fenolik menggunakan rumus, sebagai berikut

$$\text{Kadar Total Fenolik} = \frac{V \text{ (ml)} \times X \text{ (mg/ml)}}{M \text{ (gr)}} \dots \text{(Ningsih, dkk., 2020)}$$

Pada rumus tersebut V merupakan volume ekstrak, X merupakan konsentrasi flavonoid dalam ekstrak, dan M merupakan berat ekstrak kemudian hasil kadar total fenolik dinyatakan dengan satuan mg GAE/g (Mukhriani, et al., 2019).

3.5.6 Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat dan bahan (kecuali ekstrak etanol daun jeruk nipis) yang akan digunakan disterilisasi dengan autoklaf dan diatur tekanan 1 atm dalam suhu 121°C selama 20 menit setelah dicuci hingga bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas alat-alat seperti erlemneyer, cawan petri, gelas ukur, pinset, tabung reaksi serta bahan yang disterilisasi adalah air fisiologis, media pertumbuhan bakteri yaitu *Nutrien Agar*, media uji aktivitas antibakteri *Mueller Hinton Agar* dan *Mueller Hinton Broth*. Sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan mikroba yang menempel pada alat dan bahan.

3.5.7 Pembuatan Media

a. Media *Nutrien Agar*

Nutrien Agar (NA) ditimbang sebanyak 2,8 gram kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades di erlenmeyer kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan menggunakan *hot plate*. Setelah masak, media akan berwarna kuning jernih. Media tersebut didinginkan pada suhu 40-45°C untuk selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf dan diatur tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. Media *Mueller Hinton Agar*

Mueller Hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak 9,15 gram kemudian dilarutkan dengan 250 ml akuades di erlenmeyer kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan hingga mendidih dengan menggunakan *hot plate*. Media tersebut didinginkan pada suhu 40-45°C untuk selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf dan diatur tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Media *Mueller Hinton Broth*

Mueller Hinton Broth (MHB) ditimbang sebanyak 3,15 gram kemudian dilarutkan dengan 150 ml akuades di erlenmeyer kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan dengan menggunakan *hot plate*. Media tersebut didinginkan pada suhu 40-45°C untuk selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf dan diatur tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.8 Peremajaan Bakteri *Propionibacterium acnes*

Media *nutrien agar* disiapkan dan disesuaikan dengan suhu ruang. Lalu, diinokulasi satu ose biakan murni bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipanaskan terlebih dahulu di atas api bunsen kemudian diambil biakan murni *Propionibacterium acnes* sebanyak satu ose dan dimasukkan ke dalam media nutrient agar. Selanjutnya, media diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang 37°C.

3.5.9 Pembuatan Suspensi Bakteri *Propionibacterium acnes*

Pembuatan suspensi bakteri uji *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan cara diambil 1 ose dari hasil peremajaan biakan murni *Propionibacterium acnes* dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml NaCl fisiologis 0,9%. Selanjutnya, divortex hingga homogen. Kemudian, kekeruhannya disetarakan dengan standar Mc. Farland. Setelah itu, suspensi bakteri yang akan digunakan diukur kerapatan bakteri menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm dan absorbansi 0,5 untuk memperoleh standar kerapatan bakteri pada $1,5 \times 10^8$ cfu/ml.

3.5.10 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Uji Antibakteri Metode Difusi

- a. Sebelum pembuatan konsentrasi larutan ekstrak etanol daun jeruk nipis terlebih dahulu dilakukan pembuatan larutan DMSO 5%. Larutan DMSO adalah pelarut pelarut organik dan tidak bersifat bakterisidal. DMSO bersifat polar maupun non polar. DMSO berfungsi untuk mengencerkan ekstrak guna memperoleh ekstrak dengan kadar konsentrasi tertentu (Assidqi, et al., 2012). Pembuatan larutan DMSO 5% dari 100% yaitu dengan cara dipipet 5 ml DMSO 100% dan

ditambahkan akuades steril ke dalam labu ukur 50 ml sampai tanda tera, lalu dihomogenkan menggunakan vortex.

- b. Pembuatan kontrol positif menggunakan tetrasiklin 0,15% dengan cara ditimbang 100 mg tetrasiklin berbentuk serbuk lalu dilarutkan menggunakan akuades steril sebanyak 1 ml, sehingga diperoleh larutan tetrasiklin dengan konsentrasi 10%. Larutan stok tetrasiklin 10% diencerkan dengan mengambil 7,5 μ l dilarutkan dengan akuades steril sampai 500 μ l, sehingga diperoleh larutan tetrasiklin dengan konsentrasi 0,15%.
- c. Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun jeruk nipis yang digunakan untuk uji difusi dibuat dengan cara, sebagai berikut:
 1. Ekstrak daun jeruk nipis 5% (50 mg ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dengan 1 ml DMSO 5%)
 2. Ekstrak daun jeruk nipis 10% (100 mg ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dengan 1 ml DMSO 5%)
 3. Ekstrak daun jeruk nipis 15% (150 mg ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dengan 1 ml DMSO 5%)
 4. Ekstrak daun jeruk nipis 25% (250 mg ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dengan 1 ml DMSO 5%)
 5. Ekstrak daun jeruk nipis 35% (350 mg ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dengan 1 ml DMSO 5%)
 6. Ekstrak daun jeruk nipis 50% (500 mg ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dengan 1 ml DMSO 5%)
 7. Ekstrak daun jeruk nipis 70% (700 mg ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dengan 1 ml DMSO 5%)

8. Ekstrak daun jeruk nipis 100% (1000 mg ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dengan 1 ml DMSO 5%).

3.5.11 Penentuan Aktivitas Antibakteri

a. Metode Difusi

Media *Mueller hinton agar* dipanaskan terlebih dahulu sampai mendidih kemudian media *Mueller hinton agar* dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml dan dicampurkan dengan 1 ml suspensi bakteri *Propionibacterium acnes*. Setelah itu, media dihomogenkan dengan digoyang seperti angka 8 sebanyak 8 kali secara pelan dan media dibiarkan selama beberapa menit hingga memadat. Setelah media memadat, disiapkan kertas cakram dengan diameter 6 mm kemudian ditetesi menggunakan ekstrak etanol daun jeruk nipis sebanyak 25 µl dengan masing-masing konsentrasi (5%, 10%, 15%, 25%, 35%, 50%, 70%, dan 100%), kontrol positif yaitu tetrasiklin 0,15%, dan kontrol negatif yaitu DMSO 5%. Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Setelah itu, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Diameter daerah hambatan diukur menggunakan jangka sorong, luas zona hambat yang terbentuk dihitung dengan rumus sebagai berikut: Zona Hambat= Zona Keseluruhan – Diameter Kertas Cakram

b. Metode Dilusi

Uji dilusi tabung atau pengenceran digunakan untuk menentukan konsentrasi hambat minimum, sedangkan uji dilusi padat atau agar digunakan untuk menentukan konsentrasi bunuh minimum. Konsentrasi ekstrak etanol daun jeruk

nipis yang digunakan uji KHM dan KBM yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%.

Pada uji konsentrasi hambat minimum (KHM) menggunakan 10 tabung reaksi steril yang sudah disiapkan dan diberi label 1-8 berisi media *Mueller hinton broth* (MHB). Pada tabung 1 diisi dengan 2 ml media MHB dan 4 ml ekstrak etanol daun jeruk nipis dengan konsentrasi 100% lalu dihomogenkan. Untuk tabung 2-8 diisi 2 ml media MHB. Kemudian diambil 2 ml larutan dari tabung 1 dan dimasukkan ke tabung 2 lalu dihomogenkan. Hal ini dilakukan berlanjut hingga tabung ke-8 dan diperoleh seri pengenceran dengan konsentrasi sebagai berikut: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%. Setelah itu, 8 tabung tersebut masing-masing diiseng dengan 1 ml suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dan dihomogenkan. Selanjutnya, tabung 9 diberi label (kontrol negatif) yaitu tabung yang berisi 2 ml media MHB dan 1 ml suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* lalu dihomogenkan. Pada tabung 10 diberi label (kontrol positif) yaitu tabung yang berisi 2 ml media MHB, 1 ml suspensi bakteri *Propionibacterium acnes*, dan 4 ml ekstrak etanol daun jeruk nipis lalu dihomogenkan. Kemudian, dilanjutkan dengan pengukuran nilai absorbansi sebelum inkubasi dan sesudah inkubasi menggunakan spektrofotometer. Menurut Warokka, et al (2016) yakni apabila nilai absorbansi sesudah inkubasi lebih besar dari sebelum inkubasi, maka masih terjadi pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada suspensi tersebut. Sebaliknya, apabila nilai absorbansi sesudah inkubasi lebih kecil dari sebelum inkubasi, maka sudah tidak terjadi pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada suspensi tersebut. Dengan demikian, nilai konsentrasi hambat minimum dapat ditentukan

dari konsentrasi ekstrak terkecil pada kelompok perlakuan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

Pada uji konsentrasi bunuh minimum (KBM) dilakukan dengan cara media *Mueller hinton agar* dipanaskan terlebih dahulu sampai mendidih kemudian media *Mueller hinton agar* dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml dan dicampur dengan masing-masing variasi konsentrasi larutan suspensi pada uji KHM sebanyak 200 µl menggunakan metode tuang dan dihomogenkan dengan digoyangkan seperti angka 8 secara pelan. Media tersebut dibiarkan hingga memadat dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, dilihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri. Media yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri merupakan nilai konsentrasi bunuh minimum, yaitu konsentrasi terkecil ekstrak yang dapat membunuh *Propionibacterium acnes*.

3.6 Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian yaitu hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang berupa diameter zona hambat. Data yang didapatkan kemudian dilakukan analisis menggunakan software SPSS 16.0. Data dianalisis dengan uji Normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji Homogenitas *Levene* kemudian dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu *Kruskall-Wallis* dan dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Mann-Whitney* apabila hasil uji *Kruskall-Wallis* ($P \text{ value} < \alpha (0,05)$). Pada hasil uji KHM dan KBM ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) ditampilkan menggunakan tabel dan dilakukan analisis secara deskriptif.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Pada penelitian ini menggunakan sampel yaitu daun jeruk nipis dari spesies *Citrus aurantifolia* yang dibuktikan oleh hasil identifikasi dan uji determinasi di UPTLH Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur. Hasil identifikasi dan uji determinasi terlampir pada lampiran 2. Daun jeruk nipis yang digunakan untuk keperluan penelitian ini diperoleh dari wilayah Sidoarjo dengan kualitas yang baik.

Daun jeruk nipis dilakukan sortasi basah dengan cara bahan dicuci hingga bersih menggunakan air mengalir supaya kotoran maupun material asing yang menempel pada permukaan daun dapat dihilangkan sehingga tidak menimbulkan kontaminasi awal yang berpotensi dapat mengganggu proses selanjutnya. Bahan yang telah bersih ditiriskan hingga tidak terdapat air. Penirisan ini dilakukan guna mengurangi kandungan air pada permukaan daun dan mencegah terjadinya pembusukan. Kemudian, daun dikeringkan menggunakan oven. Proses pengeringan dilakukan guna mengurangi kadar air dalam daun jeruk nipis sehingga proses ini mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang tidak dikehendaki. Selain itu, suhu pengeringan yang digunakan harus diperhatikan karena penggunaan suhu yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan rusaknya kandungan senyawa metabolit sekunder pada bahan. Suhu pengeringan yang baik tidak lebih dari 60°C (Warnis et al., 2020). Proses penghalusan dan pengayakan dilakukan pada daun yang telah kering. Proses penghalusan dapat dilakukan menggunakan blender supaya memperkecil ukuran bahan juga memperluas permukaan partikel bahan sehingga kontak bahan dengan pelarut semakin luas dan

mempermudah pelarut dalam menyari senyawa metabolit sekunder dari bahan pada proses ekstraksi semakin optimal serta senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan semakin besar. Pengayakan bahan dilakukan untuk menghomogenkan ukuran partikelnya (Simanjuntak, 2020).

Ekstraksi merupakan suatu metode penyarian zat aktif dari bagian tanaman yang diinginkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi bertujuan untuk mengambil senyawa kimia yang terkandung dalam simplisia yang dimana prinsip ekstraksi merujuk pada perpindahan masa komponen zat yang terlarut ke dalam pelarut (Aminah et al., 2017). Ekstraksi daun jeruk nipis dilakukan menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut yang sesuai pada wadah inert yang tertutup rapat supaya tidak mengalami kontaminasi dan penguapan pada saat proses maserasi berlangsung serta dilakukan pengadukan kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama beberapa hari. Metode maserasi dipilih karena lebih sederhana sehingga tidak menggunakan alat khusus, mudah diterapkan, dan dapat mengekstrak senyawa yang bersifat termolabil atau senyawa yang belum diketahui sifatnya.

Pada proses maserasi daun jeruk nipis, pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif (Depkes RI, 1989). Pelarut yang telah melakukan penyarian senyawa aktif akan ada dalam keadaan terpekat dan akan didorong keluar, hal ini dikarenakan terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam sel dan di luar sel. Pada ekstraksi maserasi ini dibutuhkan pelarut organik untuk melarutkan serbuk simplisia secara maksimal. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini yaitu etanol 96%.

Penggunaan etanol 96% dipilih sebagai pelarut karena bersifat universal yang memiliki kemampuan untuk melarutkan senyawa baik bersifat polar maupun non polar sehingga cocok digunakan sebagai pelarut ekstrak. Selain itu, etanol 96% memiliki kepekatan yang tinggi sehingga pelarut ini mampu menarik senyawa aktif yang terdapat pada bahan secara maksimal dan menghasilkan filtrat lebih banyak. Setelah dilakukan maserasi diperoleh filtrat ekstrak daun jeruk nipis berwarna hijau pekat dan beraroma khas.

Filtrat yang dihasilkan pada proses maserasi selanjutnya dipekatkan dengan proses evaporasi (penguapan) yang bertujuan untuk memisahkan pelarut dari larutan ekstrak daun jeruk nipis sehingga diperoleh hasil filtrat ekstrak daun jeruk nipis yaitu lebih kental dengan konsentrasi yang lebih pekat. Pada penelitian ini, proses evaporasi menggunakan suhu 60°C karena titik didih etanol 96% berkisar $78,4^{\circ}\text{C}$ (Nudiasari, dkk., 2019). Penggunaan suhu di bawah titik didih pelarut ini bertujuan untuk menghindari kerusakan senyawa aktif sehingga dapat menurunkan kualitas ekstrak tersebut (Nudiasari, dkk., 2019).

Proses evaporasi ekstrak dilakukan menggunakan *Rotary evaporator* yang memiliki prinsip vakum destilasi. Pada prinsip ini, tekanan akan mengalami penurunan dan etanol 96% akan menguap di bawah titik didihnya. Proses pemanasan pada alat ini menggunakan *Rotary evaporator* yang akan memutar labu yang berisi filtrat daun jeruk nipis oleh *Rotary evaporator* sehingga pemanasan menjadi lebih merata. Selain itu, penurunan tekanan juga diberikan saat labu yang berisi filtrat daun jeruk nipis diputar menyebabkan penguapan pelarut semakin cepat (Nudiasari, dkk., 2019).

Hasil organoleptik dari ekstrak daun jeruk nipis berwarna hijau kehitaman dapat dilihat pada gambar 4.1 karena ekstrak tersebut mengandung klorofil dan kandungan senyawa aktif lainnya yang terkandung dalam daun jeruk nipis juga bertekstur halus, bersifat kental, dan memiliki aroma yang khas dari daun jeruk nipis.



Gambar 4.1 Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S.)

(Dokumentasi Pribadi, 2022)

Hasil rendemen yang diperoleh pada ekstrak daun jeruk nipis menggunakan pelarut etanol 96% yaitu 30,2%. Hasil rendemen ekstrak daun jeruk nipis lebih besar dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim, dkk (2018) menggunakan pelarut n-heksana menghasilkan rendemen sebesar 3,115%. Adapun hasil rendemen ekstrak daun jeruk nipis dari penelitian Mulangsri, dkk (2019) menggunakan tiga pelarut yaitu etil asetat, n-heksana, dan air masing-masing menghasilkan rendemen sebesar 54,11%, 16,53%, dan 5,26%. Hasil rendemen menggunakan pelarut etil asetat lebih besar dibandingkan dengan hasil rendemen pada penelitian ini. Hasil rendemen yang tinggi disebabkan oleh adanya proses penarikan bahan saat proses ekstraksi terjadi dengan mengalirnya bahan pelarut ke dalam sel sehingga menyebabkan protoplasma mengalami pembengkakan dan bahan kandungan sel ikut terlarut sesuai dengan kelarutannya (Voight, 1994). Hal

ini selaras dengan pernyataan Vogel (1978) bahwa daya melarutkan yang tinggi berhubungan dengan kepolaran senyawa dan kepolaran pelarut yang diekstraksi.

Hasil rendemen ekstrak yang berbeda dipengaruhi oleh banyak sedikitnya senyawa aktif yang terkandung dalam suatu ekstrak, semakin banyak senyawa aktif di dalam ekstrak maka nilai rendemen juga semakin tinggi. Menurut Gupita (2021) bahwa tinggi rendahnya nilai rendemen suatu ekstrak mengindikasikan jumlah ekstrak yang dihasilkan. Selain itu, hasil rendemen ekstrak juga dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu usia tanaman, proses pemeliharaan tanaman, varietas tanaman, faktor lingkungan seperti tempat tumbuh tanaman, proses pemanenan, dan proses pengolahan tanaman (Ayunda, 2014). Adapun faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil rendemen suatu ekstrak yang dikemukakan oleh Sari, dkk (2015) antara lain waktu ekstraksi yang dimana semakin lama waktu ekstraksi yang diperlukan maka hasil ekstrak yang dihasilkan semakin banyak, luas permukaan bidang sentuh yang artinya semakin besar ukuran suatu bahan maka luas bidang sentuhnya semakin kecil dan semakin kecil juga luas permukaan pereaksi sehingga laju reaksi antara daun jeruk nipis dengan etanol 96% semakin kecil (Nurdiasari, dkk., 2019), dan peningkatan suhu dapat menyebabkan permeabilitas sel menjadi melemah sehingga memudahkan pelarut untuk mengekstrak zat dalam bahan dan rendemen yang dihasilkan semakin banyak, pengadukan, dan pelarut yang digunakan (Sari, dkk., 2015).

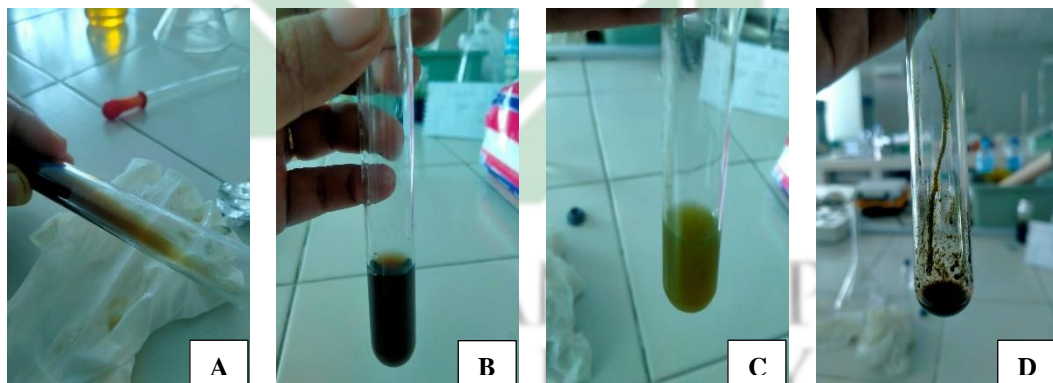
4.2 Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S.)

Pada penelitian ini dilakukan uji skrining fitokimia sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun jeruk nipis. Uji skrining fitokimia dapat dilakukan secara kualitatif maupun

kuantitatif. Pada uji skrining fitokimia secara kualitatif dapat dilakukan melalui reaksi perubahan warna dengan menggunakan suatu pereaksi tertentu pada masing-masing senyawa metabolit sekunder yang akan diuji. Sedangkan, pada uji skrining fitokimia secara kuantitatif bertujuan untuk mengetahui kadar total dari senyawa metabolit sekunder pada ekstrak daun jeruk nipis.

4.2.1 Uji Skrining Fitokimia Kualitatif

Uji skrining fitokimia secara kualitatif bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak daun jeruk nipis. Ekstrak daun jeruk nipis dilakukan uji skrining fitokimia secara kualitatif menggunakan pereaksi sesuai dengan senyawa metabolit sekunder yang akan diuji kemudian dilihat reaksi perubahan warna pada ekstrak yang dapat dilihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil Uji Kualitatif. A. Flavonoid; B. Tanin; C. Saponin; D. Fenolik (Dokumentasi pribadi, 2022)

Senyawa metabolit sekunder yang diujikan pada penelitian ini adalah flavonoid, tanin, saponin, dan fenolik. Senyawa-senyawa tersebut adalah golongan polifenol yang banyak ditemukan dalam daun jeruk nipis. Senyawa polifenol memiliki cincin benzena yang membawa lebih dari satu ion hidrogen

(Proklamaningsih, *et al.*, 2019). Hasil uji skrining fitokimia secara kualitatif pada jeruk nipis dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil uji skrining fitokimia secara kualitatif pada ekstrak daun jeruk nipis

Senyawa	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Metabolit Sekunder			
Flavonoid	Mg+HCl 38%	Kuning kehitaman	+
Tanin	FeCl ₃ 1%	Hijau kehitaman	+
Saponin	Aquades → dikocok + HCl 2N	Membentuk buih	+
Fenolik	FeCl ₃ 1%	Hitam pekat	+

Keterangan: (-) Tidak ada kandungan senyawa metabolit sekunder, (+) Ada kandungan senyawa metabolit sekunder (Data pribadi, 2022).

Berdasarkan hasil uji skrining fitokimia secara kualitatif diperoleh hasil bahwa ekstrak daun jeruk nipis positif mengandung flavonoid, tanin, saponin, dan fenolik. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Siregar, dkk (2020) bahwa ekstrak daun jeruk nipis positif mengandung flavonoid, tanin, dan alkaloid, tetapi tidak mengandung saponin. Perbedaan kandungan metabolit sekunder tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu genetik, cahaya, suhu, kelembaban, kondisi pH, dan kandungan unsur hara (Laily, 2012).

Uji senyawa flavonoid hasilnya positif yang ditandai dengan perubahan warna ekstrak menjadi kuning. Menurut Cobra, dkk (2019) bahwa warna kuning yang terbentuk karena adanya proses reduksi dari ekstrak dengan serbuk Mg dan HCl pekat. Hal ini sesuai dengan penelitian (Handayani, dkk., 2020) yang menyatakan bahwa kandungan senyawa metabolit sekunder ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) menunjukkan bahwa ekstrak etanol mengandung senyawa flavonoid. Flavonoid merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman dan termasuk dalam golongan senyawa fenolik (Redha, 2010). Uji flavonoid dilakukan dengan

menambahkan serbuk Mg dan HCl ke dalam ekstrak. Penambahan serbuk Mg dan HCl dimaksudkan untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavylum berwarna jingga atau merah. Flavonoid merupakan suatu senyawa yang memiliki lebih dari satu gugus hidroksil dan mengandung cincin aromatik (Ergina, dkk., 2014). Beberapa manfaat dari senyawa flavonoid yaitu dapat digunakan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, anti alergi, dan antikanker, mencegah pengeroposan tulang, melindungi struktur sel, dan meningkatkan vitamin C (Lumbessy, 2013).

Pada uji skrining fitokimia senyawa tanin dilakukan dengan menambahkan FeCl_3 dan diperoleh hasil bahwa ekstrak daun jeruk nipis mengandung senyawa tanin. Hal ini ditunjukkan dengan adanya perubahan warna ekstrak setelah ditambahkan FeCl_3 menjadi hijau kehitaman karena adanya proses reaksi antara FeCl_3 dengan salah satu gugus hidroksil aromatik (Cobra, dkk., 2019). Tanin merupakan senyawa yang bersifat polar karena memiliki gugus (-OH). Menurut Jones, et al (2006) bahwa senyawa tanin yang terindikasi positif dapat diketahui melalui perubahan warna larutan menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman apabila ditambahkan dengan FeCl_3 . FeCl_3 digunakan untuk menentukan ada atau tidaknya ekstrak tersebut mengandung gugus fenol. Tanin merupakan golongan senyawa polifenol. Terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru kehitaman pada ekstrak setelah ditambahkan FeCl_3 karena tanin membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} (Ergina, dkk., 2016). Adapun perbedaan perubahan warna tanin saat ditambahkan FeCl_3 yaitu biru kehitaman apabila tanin mengalami hidrolisis, sedangkan warna hijau kehitaman apabila tanin mengalami kondensasi (Wahid dan Safwan, 2020). Adapun khasiat dari senyawa tanin adalah penangkal radikal bebas,

astringen, antibakteri, dan antidiare, selain itu dapat dimanfaatkan untuk mengendapkan protein (Malanggi, dkk., 2012).

Uji saponin ekstrak daun jeruk nipis menunjukkan hasil positif mengandung senyawa saponin yang ditunjukkan dengan adanya buih yang terbentuk di permukaan larutan ekstrak. Penambahan HCl setelah dilakukan pengocokkan ditujukan untuk melihat buih tetap stabil terbentuk. Selaras dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Harborne (1987) bahwa buih yang terbentuk sebab senyawa saponin mengandung suatu senyawa yang larut dalam pelarut non polar (hidrofobik) dan senyawa yang sebagian dapat larut dalam air (hidrofilik) sebagai surfaktan yang mampu menurunkan tegangan permukaan. Saat larutan ekstrak digojok gugus hidrofobik akan berikatan dengan udara, sedangkan gugus hidrofilik akan berikatan dengan air sehingga dapat membentuk buih (Sulistyarini, dkk., 2020). Saponin merupakan senyawa yang bersifat polar karena terdapat ikatan glikosida. Saponin juga termasuk senyawa aktif permukaan yang mudah diamati melalui kemampuannya dalam membentuk buih (Wahid dan Safwan, 2020). Beberapa manfaat dari senyawa saponin secara biologis yaitu antiprotozoa, antimollusca, aktivitas antibakteri, kemampuan dalam membentuk senyawa kelat dengan logam, kemampuan hemolitik, efek hipokolesterolemia, antikanker, antivirus (Yanuartono, dkk., 2017).

Uji senyawa fenolik dilakukan dengan menambahkan pereaksi FeCl_3 1% diperoleh hasil bahwa ekstrak daun jeruk nipis positif mengandung fenolik yang diindikasikan dengan perubahan warna larutan menjadi hitam pekat. Hal ini sesuai dengan penelitian Susanti, dkk (2017) bahwa penambahan FeCl_3 1% pada uji kualitatif senyawa fenol dikatakan positif apabila terbentuk warna hitam pekat,

ungu, hijau, biru, dan merah. Penentuan fenolik secara kualitatif dapat dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu. Reagen Folin-Ciocalteu bersifat basa memiliki kemampuan untuk mengoksidasi gugus -OH (hidroksil) dari golongan senyawa fenolik. Perubahan warna terjadi karena senyawa fenolik diubah menjadi ion fenolat melalui disosiasi proton dalam kondisi basa yang kemudian akan mereduksi asam fosfomolibdat-fosfotungstat yang terdapat dalam reagen Folin-Ciocalteu menjadi senyawa kompleks *molybdenum-tungsten* yang berwarna biru akibat adanya proses reduksi ion *molybdenum* (Mo^{6+}) menjadi ion *molybdenum* (Mo^{5+}) yang digunakan sebagai indikator adanya senyawa fenolik pada ekstrak (Putri, dkk., 2018). Senyawa fenolik dapat dimanfaatkan sebagai aktivitas antimikroba, antioksidan, antikarsinogenik, dan anti-penuaan (Diniyah, dan Han Lee, 2020).

4.2.2 Uji Skrining Fitokimia Kuantitatif

Ekstrak daun jeruk nipis yang telah dilakukan pengujian skrining fitokimia secara kualitatif selanjutnya dilakukan pengujian skrining fitokimia secara kuantitatif. Uji skrining fitokimia secara kuantitatif daun jeruk nipis dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui kadar total flavonoid dan fenolik. Pemilihan dua senyawa aktif yang akan diuji kuantitatif ini karena senyawa flavonoid dan fenolik merupakan golongan polifenol berdistribusi luas pada tanaman (Namani, et.al., 2018). Pada penelitian ini senyawa tanin dan saponin tidak diuji kuantitatif dikarenakan senyawa-senyawa ini tergolong dalam senyawa fenolik. Adapun senyawa flavonoid dan fenolik merupakan suatu senyawa polar yang dimana saat proses ekstraksi terjadi penarikan senyawa yang paling banyak pada ekstrak daun jeruk nipis. Hal ini dikarenakan pelarut yang digunakan pada ekstraksi adalah etanol 96% sehingga mampu menarik senyawa polar lebih banyak

seperti senyawa flavonoid dan fenolik. Selain itu pelarut ini juga mampu menarik senyawa semi polar dan non polar namun dalam jumlah sedikit (Mukhriani, et al., 2019).

Pembuatan kurva baku untuk kadar total flavonoid daun jeruk nipis menggunakan larutan baku kuersetin dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Penggunaan kuersetin sebagai larutan baku dikarenakan kuersetin adalah senyawa flavonoid yang termasuk dalam golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan mempunyai gugus hidroksil pada C-3 atau C-5 yang bertetangga dengan flavon dan flavonol, selain itu kuersetin merupakan salah satu flavonol terbaik yang banyak ditemukan di tanaman (Mukhriani, et al., 2019). Flavon merupakan salah satu senyawa flavonoid yang tidak ditemukan gugus hidroksil pada atom C-3. Flavon yang sering ditemukan yaitu luteolin dan apigenin, sedangkan flavonol merupakan salah satu senyawa yang memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 dan terdapat dalam bentuk glikosida dengan bentuk umum seperti mirisetin, kaemferol, dan kuersetin. Jenis glikosida yang paling sering ditemukan adalah rutin. Selain itu, flavonol juga banyak tersebar dalam tanaman sebagai pigmen antosianin baik dalam petal maupun daun tanaman tingkat tinggi (Arifin dan Ibrahim, 2018).

Larutan baku kuersetin berwarna kuning, hal ini selaras dengan semakin tinggi konsentrasi maka warna kuning yang dihasilkan semakin pekat (Namani, et.al., 2018). Penentuan kadar total flavonoid menggunakan prinsip dari reaksi kolorimetri yaitu setelah ekstrak daun jeruk nipis direaksikan dengan $AlCl_3$ dalam medium asam. $AlCl_3$ yang ditambahkan dalam sampel mampu membentuk kompleks antara $AlCl_3$ dengan kuersetin sehingga terjadi pergeseran panjang

gelombang tampak (visible) dan ditandai dengan larutan yang menghasilkan warna yang lebih kuning. Kalium asetat yang ditambahkan berfungsi untuk mempertahankan panjang gelombang pada area tampak (visible) (Mukhriani, et al., 2019). Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum adalah 428,0 nm. Pengukuran ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui panjang gelombang saat mencapai serapan maksimum dan memiliki daya serap yang relatif konstan (Mukhriani, et al., 2019).

Penentuan kadar fenolik total menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu. pembuatan kurva baku untuk kadar total fenolik daun jeruk nipis menggunakan larutan baku asam galat dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Asam galat digunakan sebagai larutan baku karena asam galat merupakan salah satu senyawa fenol alami turunan asam hidroksibenzoat yang termasuk dalam golongan asam fenolik sederhana juga sebagai standar yang ketersediaan substansinya stabil dan murni (Sam, dkk., 2016). Asam galat direaksikan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu yang merupakan reagen pengoksidasi berupa larutan berwarna kuning yang selanjutnya senyawa fenolik pada sampel akan dioksidasi oleh molibdat tungstat yaitu komponen dari reagen Folin-Ciocalteu yang bertugas untuk mereduksi gugus hidroksil sehingga membentuk senyawa berwarna biru yang bisa diukur hingga panjang gelombang maksimum (Xia, Deng, Guo, dan Li, 2010). Setelah itu larutan ditambahkan dengan Na_2CO_3 karena reagen Folin-Ciocalteu hanya mampu bereaksi pada suasana basa. Reagen Folin-Ciocalteu bersifat asam saat ditambahkan dengan dengan sampel atau ekstrak sehingga ditambahkan larutan Na_2CO_3 yang digunakan untuk membuat susunan menjadi basa (Sam, dkk., 2016). Hasil pengukuran panjang gelombang

maksimum adalah 669,0 nm yang digunakan untuk mengetahui serapan zat yang dibaca oleh spektrofotometer UV-Vis secara optimal.

Berdasarkan pengukuran hasil uji skrining fitokimia kuantitatif daun jeruk nipis didapatkan nilai kurva kalibrasi standar kuersetin dengan persamaan regresi $y = 0,00765x + 0,0611$ dan nilai koefisien korelasi persamaan kurva kalibrasi standar kuersetin yaitu $R^2 = 0,96798$. Sedangkan nilai kurva kalibrasi standar asam galat dengan persamaan regresi $y = 0,01232x - 0,1303$ nilai koefisien korelasi persamaan kurva kalibrasi standar asam galat yaitu $R^2 = 0,95059$. Nilai koefisien korelasi (R) yang mendekati 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linear (Mukhriani, et al., 2019). Hasil dari perhitungan ini menggunakan hukum Lambert-Beer yang menunjukkan bahwa absorbansi dan konsentrasi memiliki korelasi yang kuat. (Asmorowati dan Lindawati, 2019). Perhitungan kadar total flavonoid dan total fenolik menggunakan persamaan regresi linear. Kadar total flavonoid dinyatakan dengan *Quercetin Equivalent* (QE) dan kadar total fenolik dinyatakan dengan *Gallic Acid Equivalent* (GAE). Hasil uji skrining fitokimia kuantitatif ekstrak daun jeruk nipis ditampilkan pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia Secara Kuantitatif Pada Ekstrak Daun Jeruk Nipis

Ekstrak Daun Jeruk Nipis	
Kadar total flavonoid	6,41 mg QE/g
Kadar total fenolik	36,52 mg GAE/g

(Data Pribadi, 2022)

Berdasarkan tabel 4.2 dapat dilihat bahwa nilai kadar total flavonoid sebesar 6,41 mg QE/g dan nilai kadar total fenolik sebesar 36,52 mg GAE/g. Kadar total fenolik lebih besar daripada kadar total flavonoid. Hal ini dikarenakan flavonoid merupakan golongan dari senyawa fenolik. Kadar total fenolik daun jeruk nipis

menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan penelitian Yuniarty (2021) yaitu 0,687 mg GAE/g. Sama halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Namani et al (2018) diketahui bahwa nilai kadar total fenolik maupun kadar total flavonoid yang diperoleh lebih besar yaitu 0,322 mg GAE/g dan 0,041 mg QE/g. Kadar total fenolik dan kadar total flavonoid pada penelitian ini lebih tinggi dari daripada penelitian Yuniarty (2021) dan Namani, et al (2018). Selain itu, penelitian ini menghasilkan nilai kadar total fenolik lebih besar dari kadar total flavonoid. hal ini terjadi karena senyawa flavonoid yaitu salah satu golongan dari senyawa fenolik sehingga ada selisih antara kadar total fenolik dengan flavonoid sebesar 30,41 mg. Hasil tersebut merupakan senyawa lain yang berasal dari senyawa fenolik yang memiliki cincin aromatik dan lebih dari satu gugus hidroksil (-OH) seperti senyawa tanin, saponin, stilben, hidrokuinon, resorsinol, katekol, asam fenolat, asam hidroksisinamat, dan kumarin (Diniyah dan Han Lee., 2020).

Perbedaan nilai kadar total flavonoid dan kadar total fenolik daun jeruk nipis ini disebabkan perbedaan lokasi tumbuh tanaman yaitu Sidoarjo pada penelitian ini, Sulawesi Tengah pada penelitian Yanuarty (2021), dan Oman pada penelitian Namani, et al (2018). Hal ini didukung oleh pernyataan dari Borges et al (2013) bahwa faktor lingkungan juga dapat mempengaruhi komponen flavonoid dan fenolik seperti suhu, curah hujan, komposisi tanah, radiasi UV (ultraviolet). Selain itu, pemilihan pelarut merupakan salah satu faktor penting dalam mengekstraksi komponen flavonoid dan fenolik. Menurut Khoddami, et al (2013) bahwa senyawa flavonoid terdistribusi secara luas pada jaringan tanaman dalam bentuk glikosida dan bersifat polar. Faktor internal yaitu umur dan kematangan suatu tanaman

mampu mempengaruhi kandungan metabolit sekunder dalam tanaman tersebut seperti komponen flavonoid dan fenolik (Supriatna, et al., 2019).

4.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

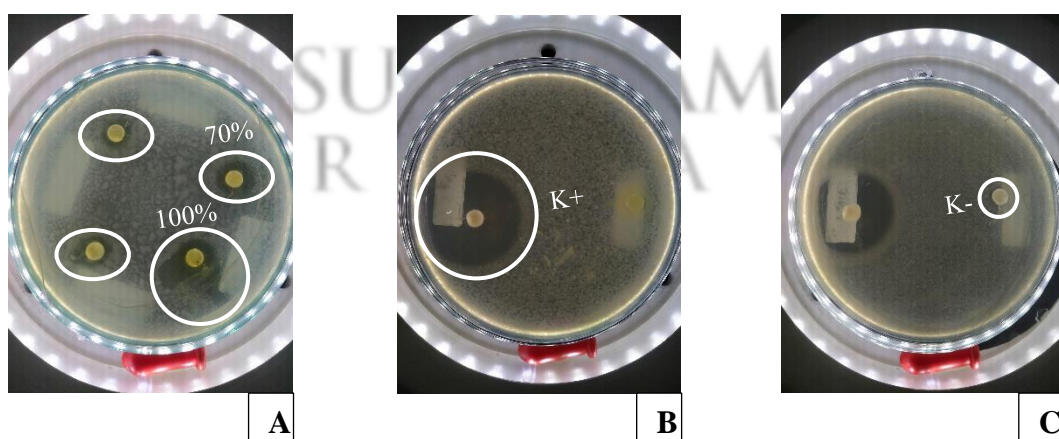
Pada penelitian ini, uji aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk nipis menggunakan metode difusi dan dilusi. Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk menentukan tingkat kerentanan atau sensitivitas bakteri terhadap zat antibakteri dan mengetahui senyawa murni yang memiliki aktivitas antibakteri. Metode difusi dilakukan untuk mengetahui daya hambat zat antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* yang ditunjukkan dengan pembentukan zona bening, sedangkan metode dilusi digunakan untuk mengetahui nilai konsentrasi hambat minimum dan bunuh minimum yang ditunjukkan melalui pengukuran nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi bakteri *Propionibacterium acnes* kemudian konsentrasi bunuh minimum dilakukan dengan melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada media agar.

4.3.1 Uji Difusi

Pada penelitian ini, uji aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk nipis terhadap aktivitas pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan metode difusi cakram (Tes *Kirby-Bauer*) yang digunakan untuk menentukan tingkat kerentanan bakteri *Propionibacterium acnes* terhadap ekstrak daun jeruk nipis yang ditunjukkan dengan mengukur nilai diameter zona hambat yang terbentuk mengelilingi kertas cakram. Ekstrak daun jeruk nipis dengan berbagai variasi konsentrasi dilarutkan dalam DMSO 5%. Pemilihan larutan DMSO sebagai pelarut sebab pelarut tersebut dapat melarutkan hampir seluruh senyawa baik yang bersifat

polar maupun non polar, DMSO juga tidak memberikan efek daya hambat pertumbuhan bakteri sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan dari uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar (Anita, dkk., 2019). Ekstrak daun jeruk nipis dibuat variasi konsentrasi nipis yaitu 5%, 10%, 15%, 25%, 35%, 50%, 70%, dan 100% kemudian dibandingkan dengan kontrol positif menggunakan tetrasiklin dan kontrol negatif menggunakan DMSO 5%. Setelah itu, ekstrak daun jeruk nipis dibuat seri konsentrasi dan dibuat perlakuan kontrol kemudian seri konsentrasi dan perlakuan kontrol diteteskan pada masing-masing kertas cakram.

Setelah itu dilakukan pengamatan pada kertas cakram yang diletakan di atas media yang telah berisi bakteri *Propionibacterium acnes*. Berdasarkan hasil pengamatan diperoleh bahwa ekstrak daun jeruk nipis memiliki kemampuan sebagai antibakteri pada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Hal ini selaras dengan terbentuknya zona hambat yang berwarna bening disekitar area kertas cakram pada uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 Zona hambat A. Ekstrak daun jeruk nipis; B. Kontrol positif; C. Kontrol negatif

(Dokumentasi Pribadi, 2022)

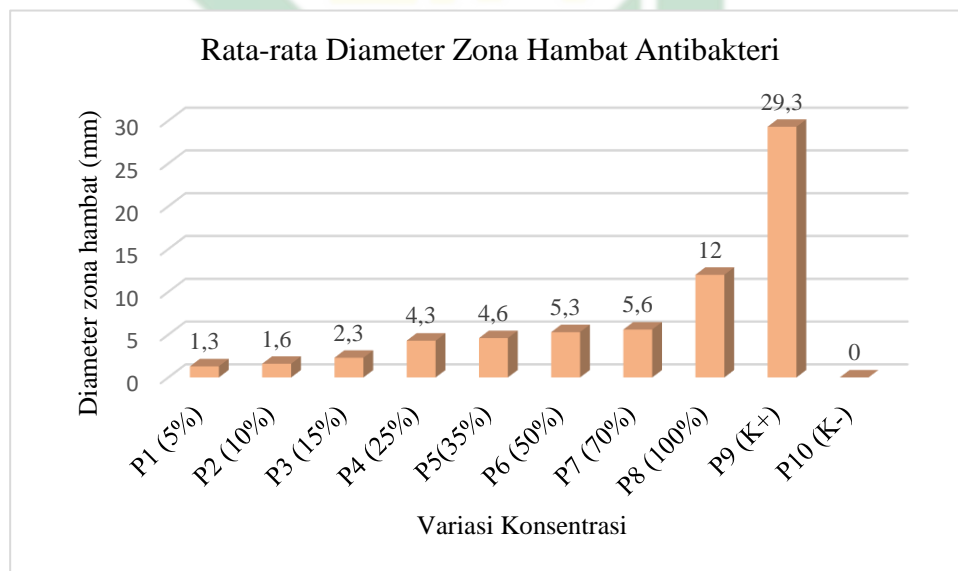
Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona hambat pada ekstrak daun jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan metode difusi kertas cakram (tes *Kirby-Bauer*) dan diperoleh hasil yang dapat dilihat pada tabel 4.3 sebagai berikut:

Tabel 4.3 Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak daun jeruk nipis

N (Replikasi)	Kelompok Perlakuan									
	P1 (5%)	P2 (10%)	P3 (15%)	P4 (25%)	P5 (35%)	P6 (50%)	P7 (70%)	P8 (100%)	P9 (K+)	P10 (K-)
1	1	2	2	5	6	6	6	10	32	0
2	2	2	1	4	4	4	5	14	22	0
3	1	1	4	4	4	6	6	12	34	0
Rata-rata	1,3	1,6	2,3	4,3	4,6	5,3	5,6	12	29,3	0

(Data Pribadi, 2022)

Setelah diperoleh data hasil pengukuran diameter zona hambat pada ekstrak daun jeruk nipis kemudian dilakukan perhitungan nilai rata-rata diameter zona hambat dan ditampilkan dengan diagram batang pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Diagram Hasil Rata-rata Diameter Zona Hambat Setiap Perlakuan Pada Uji Difusi

(Dokumentasi Pribadi, 2022)

Berdasarkan diagram tersebut menunjukkan hasil rata-rata diameter zona hambat dari ekstrak daun jeruk nipis pada masing-masing kelompok perlakuan

sebagai berikut: konsentrasi 5% yaitu 1,3 mm, konsentrasi 10% yaitu 1,6 mm, konsentrasi 15% yaitu 2,3 mm, konsentrasi 25% yaitu 4,3, konsentrasi 35% yaitu 4,6 mm, konsentrasi 50% yaitu 5,3 mm, konsentrasi 70% yaitu 5,6, dan konsentrasi 100% yaitu 12 mm. Pada kontrol positif diperoleh hasil rata-rata diameter zona hambat yaitu 29,3 mm, sedangkan kontrol negatif yaitu 0 mm. Hal ini membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka zona hambat yang terbentuk semakin besar. Efek dari ekstrak daun jeruk nipis sebagai antibakteri yang paling efektif pada konsentrasi 100%, sedangkan pada konsentrasi ekstrak terkecil yaitu 5% dinilai kurang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Adapun kriteria nilai zona hambat berdasarkan kekuatan daya antibakterinya menurut Davis dan Stout (1971) yaitu diameter zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat, diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat, diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, dan diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah. Berdasarkan kriteria tersebut, maka daya antibakteri ekstrak daun jeruk nipis terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan konsentrasi ekstrak 5% (1,3 mm), 10% (1,6 mm), 15% (2,3 mm), 25% (4,3 mm), dan 35% (4,6 mm) termasuk kategori lemah, kemudian konsentrasi ekstrak 50% (5,3 mm) dan 70% (5,6 mm) termasuk kategori sedang, dan konsentrasi ekstrak 100% (12 mm) termasuk kategori kuat. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis 100% merupakan konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* karena konsentrasi tersebut daya antibakterinya dikategorikan kuat untuk membentuk zona hambatan yang besar.

Kemampuan suatu ekstrak antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri tergantung pada konsentrasi ekstrak antibakteri yang dipakai. Selain faktor konsentrasi ekstrak, kandungan senyawa aktif pada ekstrak yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini, aktivitas antibakteri daun jeruk nipis diduga karena adanya kandungan senyawa aktif yang bermanfaat sebagai antibakteri yaitu flavonoid, tanin, saponin, dan fenolik.

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dibagi menjadi tiga yaitu menghambat fungsi membran sel, menghambat metabolisme energi, dan menghambat sintesis asam nukleat (Rijayanti, 2014). Dalam menghambat fungsi membran sel, senyawa flavonoid akan membentuk senyawa kompleks dari protein ekstraseluler dan terlarut sehingga membrane sel mengalami kerusakan dan senyawa intraseluler akan keluar (Nuria, 2009). Adapun tambahan dari Li H et. al (2003) bahwa senyawa flavonoid dapat menghambat fungsi membrane sel karena permeabilitas membrane sel terganggu dan menghambat ikatan enzim seperti fosfolipase dan ATPase. Dalam menghambat metabolisme energi yaitu dengan cara menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri yaitu dengan mencegah pembentukan energi pada membran sitoplasma dan menghambat motilitas bakteri yang berperan dalam aktivitas antibakteri dan protein ekstraseluler (Nomer, dkk., 2019). Selain itu, flavonoid juga menghambat pada sitokrom C reduktase yang menyebabkan proses pembentukan metabolisme energi terhambat. Energi inilah yang dibutuhkan oleh bakteri untuk biosintesis makromolekul (Cushni et. al., 2005). Sedangkan, dalam menghambat sintesis asam nukleat, cincin A dan cincin B pada senyawa flavonoid digunakan untuk proses ikatan hidrogen atau interkelas yaitu dengan menumpuk basa asam nukleat sehingga dapat menghambat

pembentukan DNA dan RNA. Pada letak gugus hidroksil 2', 4' atau 2', 6 dihidroksilasi pada cincin B dan 5,7 dihidroksilasi pada cincin A yang memiliki peran penting terhadap aktivitas antibakteri flavonoid. Hasil dari interaksi flavonoid dapat menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom (Nagappan, et al., 2011).

Mekanisme kerja tanin sebagai senyawa antibakteri dilakukan dengan cara menyebabkan sel *Propionibacterium acnes* menjadi lisis. Menurut Ngajow, dkk (2013). Senyawa tanin memiliki target yaitu dinding polipeptida pada dinding sel bakteri sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel *Propionibacterium acnes* mengalami lisis karena tekanan osmotik dan fisik sehingga sel bakteri akan mati kemudian sel bakteri akan mati (Sari, dkk., 2011). Selain itu, bakteri yang tumbuh pada kondisi aerobik membutuhkan zat besi untuk berbagai fungsi yaitu reduksi dari precursor ribonukleotida DNA. Tanin juga memiliki kemampuan untuk menginaktivkan enzim pada sel bakteri seperti enzim reverse transcriptase dan DNA topoisomerase yang tidak dapat terbentuk oleh kapasitas pengikat besi yang kuat oleh tanin, serta mengganggu jalannya protein pada lapisan dalam sel (Sapara, dkk., 2016).

Mekanisme kerja saponin sebagai senyawa antibakteri yaitu dengan cara terjadinya kebocoran protein dan enzim dari dalam sel *Propionibacterium acnes* (Madduluri, dkk., 2011). Menurut Poelangan dan Praptiwi (2012) bahwa saponin merupakan senyawa aktif yang permukaannya mirip dengan deterjen sehingga saponin dapat menurunkan tegangan pada permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran sel. Rusaknya permeabilitas membrane sel mengganggu kelangsungan hidup bakteri. Saponin berdifusi melalui dinding sel dan

membrane yang luar yang rentan lalu mengikat membrane sitoplasma sehingga dapat mengurangi dan mengganggu kestrabilan dari membrane sel. Kemudian, terjadilah kebocoran sitoplasma yang keluar dari sel dan mengakibatkan kematian pada sel (Geyter, et al., 2007).

. Mekanisme kerja fenolik sebagai senyawa antibakteri yaitu dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dengan cara karena fenol merupakan alkohol yang memiliki sifat asam. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara protein dan fenolik yang mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ikatan hidrogen tersebut mampu mempengaruhi membrane sitoplasma dan permeabilitas dinding sel bakteri karena keduanya tersusun atas protein. Apabila membrane sitoplasma dan permeabilitas dinding sel terganggu maka dapat menyebabkan ketidakseimbangan ion dan makromolekul dalam sel sehingga sel mengalami lisis (Marfuah, dkk., 2018).

Data hasil pengukuran diameter zona hambat aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk nipis dianalisis secara statistika menggunakan software SPSS 16. Pengujian ini didahului dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak. Hasil analisis data dari uji normalitas *Shapiro-Wilk* ditampilkan pada tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil Analisis Data Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Keterangan	Kelompok Perlakuan									
	P1 (5%)	P2 (10%)	P3 (15%)	P4 (25%)	P5 (35%)	P6 (50%)	P7 (70%)	P8 (100%)	P9 (K+)	P10 (K-)
Uji <i>Shapiro- Wilk</i>	P value= 0,000									

(Data Pribadi, 2022)

Berdasarkan hasil dari analisis data uji normalitas *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai $P \text{ value } 0,000 < \alpha 0,05$, maka diperoleh hasil bahwa data tidak berdistribusi normal. Setelah itu, dilanjutkan analisis data uji homogenitas *Levene*. Hasil analisis data uji homogenitas *Levene* dapat dilihat pada tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil Analisis Data Uji Homogenitas *Levene*

Keterangan	Kelompok Perlakuan									
	P1 (5%)	P2 (10%)	P3 (15%)	P4 (25%)	P5 (35%)	P6 (50%)	P7 (70%)	P8 (100%)	P9 (K+)	P10 (K-)
Uji <i>Levene</i>	P value= 0,000									

Berdasarkan hasil analisis data uji homogenitas *Levene* didapatkan $P \text{ value } 0,000 < \alpha 0,05$, maka diperoleh hasil bahwa data tidak homogen. Karena data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen sehingga tidak memenuhi persyaratan untuk melakukan uji *One Way Anova* maka analisis data dapat dilakukan dengan uji statistika non parametrik menggunakan uji *Kruskall-Wallis*. Hasil analisis data uji *Kruskall-Wallis* dapat dilihat pada tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil Analisis Data Uji *Kruskal-Wallis*

Keterangan	Kelompok Perlakuan									
	P1 (5%)	P2 (10%)	P3 (15%)	P4 (25%)	P5 (35%)	P6 (50%)	P7 (70%)	P8 (100%)	P9 (K+)	P10 (K-)
Uji <i>Kruskall-Wallis</i>	P value= 0,001									

(Data Pribadi, 2022)

Berdasarkan hasil analisis data uji *Kruskall-Wallis* didapatkan hasil $P \text{ value } 0,001 < \alpha 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna pada setiap kelompok perlakuan. Perbedaan bermakna ini menunjukkan bahwa perlakuan variasi konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis yang telah diberikan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Untuk melihat perbedaan bermakna secara signifikan antara dua kelompok perlakuan dengan derajat keakuratan 95% (nilai $\alpha 0,05$) atau ($P \text{ value } < 0,05$) dapat dilakukan menggunakan

uji *Mann-Whitney*. Hasil analisis data uji *Mann-Whitney* dapat dilihat pada tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil Analisis Data Uji *Mann-Whitney*

P	Kelompok Perlakuan								
	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	0,456	0,346	0,043*	0,043*	0,043*	0,043*	0,046*	0,046*	0,034*
P2		0,637	0,043*	0,043*	0,043*	0,043*	0,046*	0,046*	0,034*
P3			0,105	0,105	0,072	0,046*	0,050*	0,050*	0,037*
P4				0,796	0,239	0,068	0,046*	0,046*	0,034*
P5					0,456	0,239	0,046*	0,046*	0,034*
P6						0,796	0,046*	0,046*	0,034*
P7							0,046*	0,046*	0,034*
P8								0,050*	0,037*
P9									0,037*

Keterangan: Tanda (*): nilai yang signifikan pada setiap perlakuan (*P value* < 0,05)

P: kelompok perlakuan (Data Pribadi, 2022)

Berdasarkan hasil analisis data uji *Mann-Whitney* didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada seluruh kelompok perlakuan kecuali pada perlakuan P1 (5%) dengan P2 (10%), P1 (5%) dengan P3 (15%), P2 (10%) dengan P3 (25%), P3 (15%) dengan P4 (25%), P3 (15%) dengan P5 (35%), P3 (15%) dengan P6 (50%), P4 (25%) dengan P5 (35%), P4 (25%) dengan P6 (50%), P4 (25%) dengan P7 (70%), P5 (35%) dengan P6 (70%), P5 (35%) dengan P7 (70%), dan P6 (50%) dengan P7 (70%) yang tidak memiliki perbedaan nyata terhadap proses penghambatan pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Hal ini berarti konsentrasi ekstrak tersebut menunjukkan efek yang sama dalam menghambat pertumbuhan aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes*. Sedangkan, pada P8 (100%) memiliki perbedaan nyata terhadap semua kelompok perlakuan baik variasi konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis maupun kontrol positif dan kontrol negatif. Dengan demikian, pada P8 (100%) mengindikasikan bahwa konsentrasi tersebut

adalah konsentrasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.

4.3.2 Uji Dilusi

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi yang memiliki dua Teknik pengerjaan yaitu teknik dilusi cair dan teknik dilusi padat yang bertujuan untuk menentukan aktivitas antibakteri. Pada penelitian ini, teknik dilusi cair digunakan untuk menentukan nilai konsentrasi hambat minimum yang dilakukan dengan membuat seri pengenceran antibakteri yang ditunjukkan dengan mengukur nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi suspensi larutan antibakteri ekstrak daun jeruk nipis yang berisi suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* kemudian ditentukan konsentrasi terendah yang mampu menghambat aktivitas bakteri. Sedangkan teknik dilusi padat digunakan untuk menentukan nilai konsentrasi bunuh minimum yang dilakukan dengan menanam suspensi larutan dari konsentrasi hambat minimum ke dalam media agar lalu diinkubasi selama 24 jam kemudian diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada media agar.

A. Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Pada uji difusi cakram diperoleh hasil diameter zona hambat terbaik yaitu konsentrasi 100%. Konsentrasi 100% digunakan untuk uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) menggunakan metode dilusi cair. Pada metode dilusi cair dilakukan dengan membuat seri pengenceran dari konsentrasi 100% ekstrak daun jeruk nipis dibuat lebih kecil dari konsentrasi tersebut menggunakan metode serial dilusi perbandingan 1:2 (w/v) yaitu konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%. Seri konsenstrasi pengenceran tersebut kemudian

dibandingkan dengan kontrol positif menggunakan ekstrak daun jeruk nipis dan kontrol negatif menggunakan suspensi bakteri. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dapat ditentukan dari konsentrasi terendah ekstrak daun jeruk nipis yang mampu menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*, tetapi tidak membunuh bakteri *Propionibacterium acnes*.

Nilai konsentrasi hambat minimum ditentukan dengan melihat konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis yang menunjukkan ada atau tidak adanya pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dalam suspensi uji. Uji konsentrasi hambat minimum dapat dilakukan dengan mengukur selisih nilai *Optical density* sebelum dan setelah diinkubasi dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis untuk mendapatkan hasil yang terbukti keakuratannya (Warokka, et al., 2016). Panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur *optical density* dari jumlah mikroba tersebut adalah 600 nm. Menurut Warokka, et al (2016) bahwa penggunaan panjang gelombang 600 nm, sel-sel bakteri dapat menyerap pada panjang gelombang tersebut. Apabila nilai *optical density* setelah inkubasi terjadi kenaikan, maka dapat dikatakan bahwa masih adanya aktivitas pertumbuhan bakteri. Sedangkan, apabila nilai *optical density* setelah inkubasi terjadi penurunan, maka dapat dikatakan bahwa tidak adanya aktivitas pertumbuhan bakteri (Warokka, et al., 2016). Inkubasi dilakukan untuk mendapatkan sebuah biakan murni tanpa adanya bakteri yang tidak dikehendaki ikut tumbuh. Berikut ini hasil pengukuran *optical density* ekstrak daun jeruk nipis yang ditampilkan pada tabel 4.8.

Tabel 4.8 Hasil Pengukuran OD (*Optical Density*) Ekstrak Daun Jeruk Nipis

Perlakuan	Sebelum Inkubasi	Setelah Inkubasi	Hasil
D1 (100%)	1,928	0,397	-1,531
D2 (50%)	1,227	0,912	-0,315

D3 (25%)	0,604	0,890	+0,286
D4 (12,5%)	0,293	0,694	+0,401
D5 (6,25%)	0,131	0,530	+0,399
D6 (3,125%)	0,047	0,440	+0,393
D7 (1,56%)	0,024	0,415	+0,391
D8 (0,78%)	0,033	0,248	+0,215
K+ (kontrol positif)	1,999	0,474	-1,525
K- (kontrol negatif)	-0,140	0,183	+0,323

(Data Pribadi, 2022)

Keterangan: (+): Peningkatan aktivitas pertumbuhan bakteri

(-): Penurunan aktivitas pertumbuhan bakteri

Berdasarkan hasil pengukuran pada tabel 4.8 diperoleh hasil bahwa nilai *optical density* dari ekstrak daun jeruk nipis pada konsentrasi 100% dan 50% mengalami penurunan nilai absorbansi sehingga terjadi penghambatan aktivitas pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Nilai konsentrasi hambat minimum ekstrak daun jeruk nipis yaitu konsentrasi 50% dengan penurunan nilai *optical density* sebesar 0,315 mengindikasikan pada konsentrasi tersebut sudah mampu menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Berbeda dengan penelitian Dewi, et al (2019) yang menunjukkan nilai konsentrasi hambat minimumnya pada konsentrasi 3,25% terjadi penghambatan aktivitas pertumbuhan *Propionibacterium acnes* yang ditandai dengan nilai absorbansi yang mengalami penurunan setelah dilakukan inkubasi. Sedangkan, konsentrasi yang lebih rendah dari 3,25% mengalami peningkatan nilai absorbansi setelah dilakukan inkubasi sehingga masih terdapat aktivitas pertumbuhan *Propionibacterium acnes* (Dewi, et al (2019)).

Pada konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78% terjadi kenaikan nilai *optical density* sehingga masih terdapat aktivitas pertumbuhan *Propionibacterium acnes*, sehingga konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis yang lebih rendah dari 50% belum mampu menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Kenaikan nilai *Optical density* terjadi ini tidak sepenuhnya disebabkan oleh

aktivitas pertumbuhan bakteri, tetapi dapat terjadi karena adanya partikel lain dalam larutan seperti residu yang tidak homogen dengan larutan, kepekatan konsentrasi yang mampu mempengaruhi penyerapan cahaya oleh sel bakteri yang mati dalam larutan. Penggunaan metode spektrofotometer UV-Vis juga masih memiliki kekurangan yaitu sensitivitas untuk membedakan sampel dengan partikel lain atau bahan kontaminan yang dapat menyerap cahaya dalam panjang gelombang yang sama. Selain itu metode spektrofotometer UV-Vis memiliki kelebihan yaitu hasil yang diperoleh dalam bentuk data secara kuantitatif sehingga hasilnya lebih akurat (Lolongan dkk., 2016).

Hal ini terjadi karena semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis yang dipakai maka semakin terhambat aktivitas pertumbuhan bakteri yang disebabkan oleh jumlah kandungan senyawa aktif yang bersifat antibakteri dalam ekstrak semakin tinggi (Warokka, et al., 2016). Dengan demikian, nilai konsentrasi hambat minimum ekstrak daun jeruk nipis yaitu konsentrasi 50% dengan penurunan nilai *optical density* sebesar 0,315 mengindikasikan pada konsentrasi tersebut sudah mampu menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.

B. Hasil Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Pada penelitian ini uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dari ekstrak daun jeruk nipis mampu membunuh 99,9% dari jumlah koloni bakteri *Propionibacterium acnes* yang terlihat setelah diinkubasi selama 24 jam. Uji konsentrasi bunuh minimum menggunakan seri konsentrasi yang sama dengan konsentrasi hambat minimum yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% yang kemudian

dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Seri konsentrasi didapat dari hasil uji KHM yang kemudian diinokulasikan pada media MHA dan diinkubasi selama 24 jam untuk melihat ada atau tidaknya aktivitas pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Uji konsentrasi bunuh minimum menggunakan metode dilusi padat dengan cara tuang (*pour plate*). Hasil uji konsentrasi bunuh minimum ditampilkan pada tabel 4.9.

Tabel 4.9 Hasil Pengamatan Konsentrasi Bunuh Minimum Ekstrak Daun Jeruk Nipis Terhadap Bakteri *P. Acnes*

Perlakuan Ekstrak Daun Jeruk Nipis	Pertumbuhan Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>
D1 (100%)	+
D2 (50%)	+
D3 (25%)	++
D4 (12,5%)	++
D5 (6,25%)	++
D6 (3,125%)	++
D7 (1,56%)	++
D8 (0,78%)	++
K+ (kontrol positif)	-
K- (kontrol negatif)	++

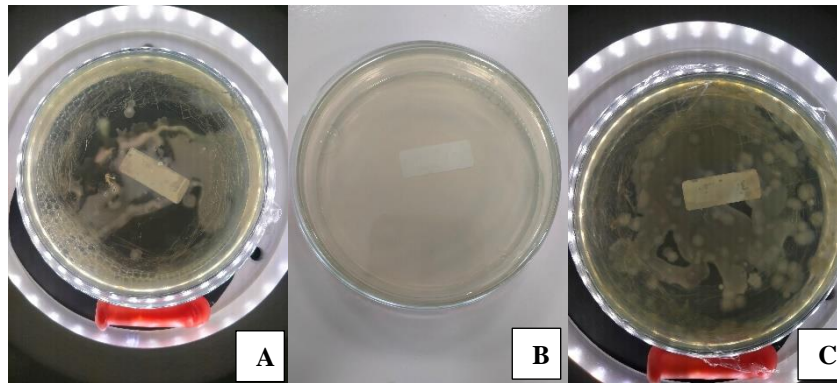
Keterangan:

(-): tidak terdapat pertumbuhan bakteri

(+): sedikit pertumbuhan bakteri

(++): banyak pertumbuhan bakteri

Berdasarkan hasil pengamatan konsentrasi bunuh minimum pada tabel 4.9 dapat disimpulkan konsentrasi bunuh minimum tidak dapat ditentukan, karena pada masing-masing perlakuan ekstrak daun jeruk nipis masih terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Propionibacterium acnes* pada media agar apabila dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif dapat dilihat pada gambar 4.4. Hal ini didukung oleh pernyataan dari Purnamasari (2013). bahwa konsentrasi bunuh minimum dapat ditentukan apabila konsentrasi terkecil dari ekstrak tersebut dapat membunuh secara keseluruhan atau paling banyak menyisakan satu koloni yang tumbuh pada media agar.



Gambar 4.5 Hasil Konsentrasi Bunuh Minimum A. Konsentrasi ekstrak 50%; B. Kontrol positif; C. Kontrol negatif (Dokumentasi Pribadi, 2022)

Ekstrak daun jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada setiap konsentrasi ekstrak yang dipakai, hal ini ditunjukkan jumlah koloni yang tumbuh pada media agar. Apabila diberikan perlakuan semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis, maka semakin sedikit jumlah koloni bakteri *Propionibacterium acnes* yang tumbuh. Sebaliknya, semakin rendah konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis, maka semakin banyak jumlah koloni bakteri *Propionibacterium acnes* yang tumbuh (Shofy, 2021). Hal ini sejalan dengan hasil konsentrasi hambat minimum yang ditunjukkan pada tabel 4.8 bahwa pada konsentrasi < 50% belum mampu menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* karena terjadi peningkatan nilai absorbansi setelah dilakukan inkubasi.

Dengan demikian, ekstrak daun jeruk nipis sebagai antibakteri memiliki sifat bakteriostatik karena hanya menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* tetapi tidak membunuh *Propionibacterium acnes*. Pada penelitian Zahrah et al (2018) menyatakan bahwa terdapat beberapa kandungan senyawa aktif dalam ekstrak *Curcuma xanthorrhiza* yang dapat membunuh *Propionibacterium acnes* sehingga ekstrak tersebut bersifat bakterisidal. Hal ini didukung oleh Rukmana (2014) bahwa senyawa yang berhasil diisolasi dari ekstrak *Curcuma xanthorrhiza* yaitu flavonoid dan tanin. Sama halnya dengan ekstrak daun jeruk nipis yang

memiliki kedua senyawa tersebut. Senyawa flavonoid dapat merusak dinding sel yang dapat mengakibatkan kematian pada sel, sedangkan senyawa tanin memiliki target pada dinding polipeptida dinding sel bakteri sehingga dinding sel yang terbentuk tidak sempurna dan selanjutnya sel akan mati (Ngajow, dkk., 2013). Pada penelitian ini telah dilakukan berbagai uji aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang meliputi pengukuran diameter zona hambat, konsentrasi hambat minimum, dan konsentrasi bunuh minimum memiliki pengaruh signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mampu digunakan sebagai antibakteri. Sesuai dengan firman Allah SWT yang terdapat dalam Al-Qur'an pada surat Al-Baqarah ayat 22 yang berbunyi:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ فِرَاشًا وَالسَّمَاءَ بِنَاءً وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجَ بِهِ مِنَ
النَّمْرَاتِ رِزْقًا لَكُمْ ۗ فَلَا تَجْعَلُوا لِلَّهِ أَنْدَادًا وَأَنْتُمْ تَعْلَمُونَ

Artinya: “Dialah yang menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu dan langit sebagai atap, dan Dia menurunkan air (hujan) dari langit, lalu Dia menghasilkan dengan hujan itu segala buah-buahan sebagai rezeki untukmu; karena itu janganlah kamu mengadakan sekutu-sekutu bagi Allah, padahal kamu mengetahui.”

Menurut tafsir Quraish Shihab (2015) pada ayat tersebut menjelaskan bahwa sesungguhnya Allah SWT telah mempersiapkan bumi dengan kekuasaannya dan membentangkan permukaan bumi supaya mudah untuk ditempati serta didayagunakan. Allah telah menjadikan langit beserta benda-benda luar angkasa dan planetnya seperti bangunan dengan fondasi yang kokoh. Allah memberikan kepada kalian sumber kehidupan dan segala nikmat yaitu air. Allah menurunkan air dari langit dan menjadikannya sebagai sebab dimana tanaman dengan subur dan pepohonan yang berbuah banyak sehingga dapat kalian ambil manfaatnya.

Berdasarkan penafisran tersebut, hendaknya kita sebagai hamba-Nya dapat selalu bersyukur dengan nikmat yang telah Allah berikan dan dapat memanfaatkan makhluk Allah lain seperti tanaman dengan sebaik-baiknya.

Tanaman dapat diolah menjadi obat herbal dan dimanfaatkan sebagai penawar berbagai penyakit. Hal ini selaras dengan hadits yang diriwayatkan oleh imam Abu Dawud nomor 3357 tentang berobat yang berbunyi sebagai berikut:

إن الله تعالى أنزل الداء والدواء وجعل لكل داء دواء فتداؤوا ولا تداؤوا بالحرام

Artinya: “*Sesungguhnya Allah telah menurunkan penyakit beserta obatnya dan menjadikan bagi setiap penyakit ada obatnya. Maka berobatlah kalian dan janganlah kalian berobat dengan yang haram.*” (HR. Abu Dawud dari Abu Darda).

Pada hadits tersebut dijelaskan bahwa setiap penyakit yang diberikan oleh Allah SWT pasti ada penawarnya. Allah menciptakan obat-obatan agar menyembuhkan suatu penyakit yang diderita oleh hamba-Nya. Dalam hadits tersebut juga mengisyaratkan perintah untuk berobat karena tindakan tersebut salah bentuk tawakkal kepada Allah. Sesungguhnya kesembuhan yang didapatkan tidak semata-mata hanya karena obat, tetapi atas ijin Allah obat yang dikonsumsi tersebut dapat membawa manfaat yang berupa kesembuhan.

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yaitu flavonoid, tanin, saponin, dan fenolik.
2. Kadar total senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebesar 6,41 mg QE/g. Sedangkan kadar total senyawa fenolik pada ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebesar 36,52 mg GAE/g.
3. Ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Variasi konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) pada setiap perlakuan memiliki pengaruh terhadap diameter zona hambat aktivitas pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Diameter zona hambat paling besar pada ekstrak daun jeruk nipis yaitu pada konsentrasi 100% sebesar 12 mm dengan kriteria daya hambat adalah kuat. Nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) ekstrak daun jeruk nipis yaitu pada konsentrasi 50% dengan hasil absorbansi -0,315. Sedangkan, nilai KBM (konsentrasi Bunuh Minimum) ekstrak daun jeruk nipis pada penelitian ini tidak dapat ditentukan karena pada media agar masih terdapat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa dapat dilakukan penelitian lebih lanjut oleh peneliti mengenai:

- 1 Ekstraksi daun jeruk nipis dapat dilakukan menggunakan metode selain maserasi
- 2 Ekstraksi daun jeruk nipis dapat menggunakan pelarut lain selain etanol 96%
- 3 Isolasi senyawa metabolit sekunder lain dari ekstrak daun jeruk nipis yang aktif sebagai senyawa antibakteri.
- 4 Uji aktivitas antibakteri ekstrak jeruk nipis dapat memanfaatkan bagian tanaman selain daunnya atau dikombinasikan dengan bagian organ tanaman lain.
- 5 Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk nipis sebagai antibakteri dapat dilakukan menggunakan bakteri patogen selain *Propionibacterium acnes*.

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR PUSTAKA

- Affandi A, Fauzia A, dan Suri DL. 2008. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal dan Konsentrasi Bunuh Maksimal Larutan Povidon Iodium 10% terhadap *Staphylococcus aureus* Resisten Metsilin (MRSA) dan *Staphylococcus aureus* Sensitif Metsilin (MSSA). *JIK* 3 (1):14 – 19.
- Afifi, Ruhana., dan Erlin, Euis. 2017. Uji Antibakteri Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Terhadap Zona Hambat Bakteri Jerawat *Propionibacterium acnes* Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 17 (2).
- Afifi, Ruhana., Erlin, Euis., dan Rachmawati, Jeti. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa blimbi* L.) Terhadap Zona Hambat Bakteri Jerawat *Propionibacterium acnes* Secara In Vitro. *Jurnal Pendidikan dan Biologi*, 10 (1).
- Aida, Ariska Nur., Suswati, Enny., dan Misnawi. 2016. Uji In Vitro Efek Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) sebagai Antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*. *E-Journal Pustaka Kesehatan*, 4(1).
- Andrea, L., Emmy M. G., dan Diana M.T. 2012. *Acne Vulgaris and Acneiform Eruptions in Dermatologi in General Medicin*. Edition Vol 1. Mc-Graw-q Hill Companies. New York. 1264-1279.
- Andries, Gabriela. 2009. *Efek Neuroterapi Kumis Kucing (Acalypha indica Linn.) Pada Otot Gastroknemius Katak Bufo melanosticus*. FK UI. Vol. 1. p:26-28
- Anita., Basarang, Mujahidah., dan Rahmawati. 2019. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Miana (*Coleus atropurpureus*) Terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Media Analis Kesehatan*, 10(1).
- Apriani, Dewi., Amaliawati, Nur., dan Kurniati, Eni. 2014. Efektivitas Berbagai Konsentrasi Infusa Daun Salam (*Eugenia polyantha* Wight) terhadap Daya Antibakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 3(1).

- Arifin, Bustanul., dan Ibrahim, Sanusi. 2018. Struktur Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. 2018. *Jurnal Zahrah*, 6(1): 21-29.
- Aristyanti, N. P. P., Wartini., N. M., Gunam., I. B. W. 2017. Rendemen dan Karakteristik Ekstrak Pewarna Bunga Kenikir (*Tagetes Erecta L.*) Pada Perlakuan Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 5 (3).
- Brook, G. F., J. S. Buttel., dan S. A. Morse. 2005. *Medical Microbiology Second Edition*. CRC Press. New York, USA.
- Cobra, Lea S., Amini, Helda W., dan Putri, Eka A. 2019. Skirining Fitokimia Ekstrak Sokhletasi Rimpang Kunyit (*Curcuma longa*) dengan Pelarut Etanol 96%. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Karya Putra Bangsa*, 1 (1):12-17. ISSN: 2657-2400.
- Cushnie, T. P., Tim. Lamb., dan Andrew J. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* I. 2005, 26:343-356.
- Diniyah, Nurud., dan Han Lee, Sang. 2020. Komposisi Senyawa Fenol Dan Potensi Antioksidan dari Kacang-Kacangan: Review. *Jurnal Agroteknologi*, 14(1).
- Djajadisastra, Joshita, et al. 2009. Formulasi Gel Topikal Dari Ekstrak Nerii Folium Dalam Sediaan Anti Jerawat. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 4 (4).
- Evika, Sandi Savitri. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat perspektif Islam*. UIN Malang Press. Malang. 4 – 5.
- Fabbrocini, G., Annunziata, MC., D'arco, V., De vita, V., Lodi, G., Mauriello MC., et. al. 2010. Review article acne scars: pathogenesis, classification and treatment. *Dermatology Research and Practice*, 1 – 13.
- Fauzi, et.al. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Jawer Kotok (*Coleus atropurpureus (L) Benth.*) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* ATTC 1223 dan *Staphylococcus epidermidis* ATTC 12228. *Farmaka*.

- Geyter, E. D., Ellen, L., Danny, G., dan Guy, S. 2007. Novel Advance With Plant Saponins As Natural Insecticides To Control Pest Insects. *Pest Technology*, 1(2): 96-105.
- Hafianty, Fitri., Batubara DE., dan Lingga, Febrina DP. 2021. Faktor Risiko Terjadinya Akne Vulgaris Pada Siswa - Siswi Kelas Xii Sma Harapan 1 Medan. *Jurnal Ilmiah Simantek*, 5(2). ISSN: 2550-0414.
- Hafsari, Anggita Rahmi., Cahyanto, Tri., dan Lestari, Rahayu Indri. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L) Less.) Terhadap *Propionibacterium acnes* Penyebab Jerawat. *Edisi Juni*, 9 (1).
- Hanuzar, Chania Hardianty., Hazar, Siti., dan Suwendar. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Cabe Rawit (*Capsicum frutacens* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri penyebab Jerawat *Propionibacterium acnes* secara Invitro. *Prosiding Farmasi*, 3(2). ISSN: 2460-6472.
- Hoover, E., Aslam, S., dan Krishnamurty, K. Physiologi, Sebaceous Glands. NCBI Bookshelf.
- Indarto., Nurulita, Windy., Anggoro, Bamabng Sri., dan Novitasari, Aulia. 2019. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong Terhadap *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Tadris Biologi*, 10(1).
- Indrayani, Ferna., dan Suryanita. 2021. Uji Potensi Limbah Kulit Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia* L) Sebagai Antiacnes. *Jurnal Kesehatan Luwu Raya*, 8(1). Hal. 107-111.
- Ismarani, Diah., Pratiwi, Liza., dan Kusharyanti, Indri. 2014. Formulasi Gel Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn) terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*. *Pharm Sci Res*, 1(1). ISSN: 2407-2354
- Julianto, Tatang Shabur. 2019. *Fitokimia: Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. UII Press. Yogyakarta. e-ISBN: 978-602-450-333-8.
- Kumalasari, Mei Lina fitri., dan Andiarna, Funsu. 2020. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kemangi. *Indonesian Journal for Health Science* 4(1): 39 – 44. ISSN: 2549 – 2748.
- Kurniawan, Aji Doni. 2015. Efektivitas Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) Sebagai Anti Nyamuk Alami. *Karya Tulis Ilmiah*. Program Studi D Iii Kesehatan Lingkungan, Stikes Muhammadiyah Samarinda.

- Kusumawati, Nursalinda., Estikomah, Solikah Ana., dan Amal, Surya. 2018. Uji Efektivitas Air Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dan Madu Randu dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Propionibacterium acnes*. *Pharmasipha*, 2(2).
- Laily, A. N., Suranto, Sugiyarto. 2012. Characteristics of *Carica pubescens* of Dieng Plateau Central Java according to its morphology, antioxidant and protein pattern. *Nusantara Bioscience*, 4(1):16- 21.
- Lestari, Yulianti., Ardiningsih, Puji., dan Nurlina. 2016. Aktivitas Antibakteri Gram Positif dan Negatif dari Ekstrak dan Fraksi Daun Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) Asal Pesisir Sungai Kakap Kalimantan Barat. *JKK*, 5(4). Hal. 1-8. ISSN: 2303-1077.
- Lestiandari, Novia., Samingan., Iswadi., Artika, Wiwit., dan Khairil. 2020. Uji Aktivitas Kombinasi Perasan Jeruk Nipus (*Citrus aurantifolia* Swingle.) Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dan Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri *Propionibacterium acnes* Secara In Vitro. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Keguruan dan Ilmu Pendidikan Unsyiah*, 5(1).
- Li, H., Wang, Z., dan Liu, Y. 2003. Review In The Studies On Tannins Activity Of Cancer Prevention And Anticancer. *Zhong-Yao-Cai*, 26(6): 444-448.
- Lim, et.al. 2019. Dietary Patterns Associated with Sebum Content, Skin Hydration, and pH, and Their Sex – Dependent Differences in Healthy Korean Adults. *Nutrients* 11(3). Pp:69.
- Madduluri S., Rao KB., dan Sitaram B. 2013. *In vitro* Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indigenous Plants Extract Against Five Bacterial Pathogens of Human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 5(4): 679-84.
- Malangngi, Liberty P., Sangi, Meiske S., dan Paendong, Jessy J. E. 2012. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.). *Jurnal Mipa Unsrat Online*, 1 (1):5-10.

- Marfuah, Isnaini., Dewi, Eko N., dan Rianingsih, Larah. 2018. Kajian Potensi Ekstrak Anggur Laut (*Caulerpa racemosa*) sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *J. Peng dan Biotek*, 7(1).
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, VII (2).
- Mukhriani., et al. 2019. Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Anggur (*Vitis vinifera* L.). *Ad-Dawaa' J. Pharm. Sci*, 2(2).
- Mursito, Bambang. 2006. *Ramuan Tradisional untuk Pelangsing Tubuh*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Murtiningsih, S., Nurbaeti, SN., dan Kusharyanti, I. 2014. Efektivitas Gel Antijerawat Ekstrak Metanol Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis* Secara In Vitro. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry* 2(4):225-234.
- Nagappan, T., P, Ramasamy., M. E. A., Wahid., T. C., Segaran., dan C. S., Vairappan. 2011. Biological Activity of Carbazole Alkaloids and Essential Oil of *Murayya koeniggi* Against Antibiotic Resistant Microbes and Cancer Cell Lines. *J. Molecules*, 16:9651-9664.
- Ngajow M, Abidjulu J, Kamu VS. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In vitro*. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. 2(2): 128-32
- Ngajow, M., Abidjulu, J., dan Kamu, VS. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Mipa Unsrat Online* 2(2):128-132.

- Noer, Shafa., Pratiwi, Dewi., dan Gresinta, Efri. 2018. Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Tanin, Saponin Dan Flavonoid Sebagai Kuersetin) Pada Ekstrak Daun Inggu (*Ruta angustifolia* L.). *Eksakta*, 18.
- Nomer, Ni Made G. R., Duniaji, Agus S., dan Nocianitri, Komang A. 2019. Kandungan Senyawa Flavonoid Dan Antosianin Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) serta Aktivitas Antibakteri terhadap *Vibrio cholerae*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 8(2):216-225.
- Nudiasari, Vicky., Suhariyadi., dan Istanto, Wisman. 2019. Efektivitas Ekstraksi Antara Maserasi dengan Digesti Terhadap Kadar Flavonoid Buah Naga Putih (*Hylocereus undatus*). *Analisis Kesehatan Sains*, 8(1). ISSN: 2320-3635.
- Nuria, Maulia Cut., A. Faizatun., dan Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediagro*, 5(2). Hal 26- 3.
- Nurmillah, Ovi Yulianti. 2009. Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). *Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research*, 9(4):54-59.
- Parama, Putu W., Sukrama, IDM., dan Handoko, Steffano A. 2019. Uji Efektifitas Antibakteri Ekstrak Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Terhadap Pertumbuhan Streptococcus Mutans In Vitro. *Bali Dental Journal*, 3(1): 45-52
- Poeloengan M, Pratiwi P. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* Linn). *Media Litbang Kesehatan*, 20(2): 65-9.
- Pratiwi, Silvia Sari., dan Ferdiansyah, Ferry. 2017. Review Artikel: Kandungan dan Aktivitas Farmakologi Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S.). *Farmaka Suplemen* 15 (2).
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta.

- Proklamaningsih, Elly., Budisantoso, Iman., dan Maula, Inayatul. 2019. Pertumbuhan dan Kandungan Polifenol Tanaman Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) Pada Media Tanam dengan Pemberian Asam Humat. *Al-Kauniyah: Journal of Biology*, 12(1): 96-102.
- Purba, Yuni Romasni. 2019. Isolasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Fenolik dari Daun Tumbuhan Kayu Hitam (*Diospyros celebica* Bakh.). *Skripsi*. Departemen Kimia, Fakultas dan Ilmu Pengetahuan Alam, Medan.
- Purnamasari, Anita., Zelviani, Sri., Sahara., dan Fuadi, Nurul. 2022. Analisis Nilai Absorbansi Kadar Flavonoid Tanaman Herbal Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Teknosains: Media Informasi dan Teknologi*, 16 (1): 57-64.
- Purnamasari, Suci. 2013. Aktivitas Antibakteri Infusa Biji Buah Langsung (*Lansium domesticum* Cor.) Terhadap *Strptococcus pneumoniae*. *Naskah Publikasi*. Program Studi dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura.
- Purwantiningsih, T. I., Yustina Y. S., dan Widodo. 2014. Aktivitas Senyawa Fenol Dalam Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Sebagai Antibakteri Alami Untuk Penghambatan Bakteri Penyebab Mastitis. *Buletin Peternakan*, 38(1)
- Putri, Dwi H., Supono., dan Hamidah. 2018. Uji Aktivitas Asap Cair Cangkang Buah Karet (*Hevea Brassiliensis*) dan Aplikasinya dalam Penghambatan Ketengikan Daging Sapi. *Alotrop*, 2 (2):97-105.
- Rachmayanti, Devinta. 2019. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etanol Kulit Buah *Citrus reticulata* Terhadap *Propionibacterium acnes* dengan Menggunakan Metode Difusi Cakram. *Skripsi*. Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.
- Radji, M. 2009. *Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Halaman 10-12.

- Rafiudin., dan Bahalwan, Farida. 2017. *Jurnal Biology Science dan Education*, 6(2). p.113.
- Ramadhinta, Talitha M., Nahzi, Muhammad Y. I., dan Budiarti, Lia Y. 2016. Uji Efektivitas Antibakteri Air Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Sebagai Bahan Irigasi Saluran Akar Alami Terhadap Pertumbuhan *Enterococcus Faecalis* In Vitro. *Dentino*, 1(2). P-ISSN: 2337-5310, E-ISSN: 2527-4937.
- Ray, C., Trivedi, P., dan Sharma, V. 2013. Acne and Its Treatment Lines. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biosciences*.
- Rijayanti, R. K. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera foetida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Naskah Publikasi*. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.
- Rosjidi, C. H. 2007. *Asuhan Keperawatan Klien dengan Cedera Kepala*. Ardhana Media. Yogyakarta.
- Sa'adah, Hayatus., Supomo., dan Musaenah. 2020. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 2(2).
- Sapara, Thresia U., Waworuntu, Olivia., dan Juliatri. 2016. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) Terhadap Pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis*. *Pharmacon*, 5(4). ISSN: 2302-2493.
- Sari, F.P., dan S. M. Sari. 2011 Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (*Jatropha multifida* Linn) sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
- Seattle, W. I. 2013. *Global Burden of Disease (GBD) Compare*. Seattle: University of Washington.

- Setiani, Ni Nyoman., Adiputra, I Gede., dan Sitepu, Israil. 2020. Daya Hambat Ekstrak Buah Jeruk Nipis Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* Penyebab Karies Gigi. *Widya Biologi*, 11(2).
- Siregar, *et. al.* 2020. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dan Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Farmasi* 3(1). E-ISSN: 2655-0814
- Sudarmi, Kadek., Darmayasa, Ida B. G., dan Muksin, I Ketut. 2017. Uji Fitokimia dan Daya Hambat Ekstrak Daun Juwet (*Syzygium cumini*) Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ATCC. *Jurnal Simbiosis* 2. ISSN: 2337-7224.
- Sudarwati, Tri Puji Lestari., dan Fernanda, M. A. Hanny Ferry. 2019. *Aplikasi Pemanfaatan Daun Pepaya (Carica papaya) Sebagai Biolarvasida Terhadap Larva Aedes aegypti*. Graniti. Gresik.
- Sugiarti, Lilis., dan Fitrianiingsih, Sri. 2018. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Parijoto (*Medinola speciosa* Blume) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*. *Cendekia Journal of Pharmacy*, 2(1).
- Susanti, N.M.P., Luh Putu MirahKusuma Dewi, Harlina SetiawatiManurung, I Made Agus Gelgel Wirasuta. 2017. Identifikasi Senyawa Golongan Fenol Dari Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper bettle* Linn) Dengan Metode KLT-Spektro fot densitometri. *Jurnal Metamorfosa*, 4(1): 108- 113.
- Tille, P. M. 2017. Balley and Scott's Diagnostic Microbiology. *In Basic Medical Microbiology 14th*. Elsevier. St. Louis Missouri. p.45.
- Ventola, C. L. 2015. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes And Threats. *PT: A Peer-Reviewed Journal For Formulary Management*, 40(4). Pp: 277-83.
- Wardani, Alvi Kusuma., Fitriana, Yuli., dan Malfadinata, Sugandi. 2019. Uji Aktivitas Antibakteri Penyebab Jerawat *Staphylococcus epidermidis* Menggunakan Ekstrak Daun Ashitaba (*Angelica keiskei*). *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 1(1).

- Warokka, Klaudya E., Wuisan, Jane., dan Juliatri. 2016. Uji konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* Steenis) sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Jurnal e-Gigi*, 4(2).
- Yanuartono., Purnamaningsih, H., Nururrozi, A., dan Indarjulianto, S. 2017. Saponin: Dampak terhadap Ternak (Ulasan). *Jurnal Peternakan Sriwijaya*, 6 (2): 79-90.
- Yanuary, Rezky. 2021. Uji Aktivitas Antioksidan Daun Jeruk NipiS (*Citrus aurantifolia*) Secara Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal FARMASINDO*, 5(1). P-ISSN : 2548-6667, E-ISSN : 2775-9032.
- Yenni., Amin Safrudin., dan Djawad Khairuddin. 2011. Perbandingan Efektivitas Adapelene 0.1% Gel Dan Isotretinoin 0.05% Gel Yang Dinilai Dengan Gambaran Klinis Serta *ProfilInterleukin 1 (IL-1)* Pada Akne vulgaris. *JST Kesehatan*.
- Zaenglein, AL, Pathyl, AI, Schlosser, BJ, et al. 2016. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 74(5):945-73.
- Zahrah, Halimatus., Arifa, Mustuka., dan Debora, Kartuti. 2018. Aktivitas Antibakteri dan Perubahan Morfologi dari *Propionibacterium Acnes* setelah Pemberian Ekstrak *Curcuma Xanthorrhiza*. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 20(3).
- Zain, Dicky Muhamad. 2012. Formulasi Krim Antibakteri dengan Kombinasi Ekstrak Propolis Lebah Lokal (*Trigona* spp) dan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Skripsi*. Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung.