

Uji Antibakteri Fraksi N-Heksana, Etil Asetat, Dan Air Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut Terhadap *Propionibacterium Acnes*

Dyah Ayu Lestari¹, Fadilah Qonitah^{2*}, Ahwan³

¹Mahasiswa Universitas Sahid Surakarta, Jl Adi Sucipto No 154 Jajar Surakarta
(0271)743493

^{2,3} Universitas Sahid Surakarta, Jl Adi Sucipto No 154 Jajar Surakarta
(0271)743493

email:¹dy.ayudyah@gmail.com;

²fadilahqonitah@usahidsolo.ac.id ; ³ahone.far02@gmail.com

Abstrak

Jerawat adalah peradangan kelenjar folikel sebaceous, salah satu penyebabnya karena infeksi bakteri. Daun jeruk purut merupakan alternatif tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri karena mengandung minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan terpenoid. Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antibakteri fraksi n-Heksana, etil asetat dan air ekstrak etanol daun jeruk purut terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Hasil analisa data dengan uji One Way ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan zona hambat rata-rata aktivitas antibakteri pada kontrol positif klindamisin 0,2 % ($27,78 \pm 0,59$), kontrol negatif DMSO 10 % (0) mm ;fraksi etil asetat 10 % ($18,8 \pm 0,15$) mm, n-Heksana 10 % ($11,93 \pm 0,33$) mm, dan fraksi air 10 % ($10,2 \pm 0,34$) mm. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan fraksi ekstrak etanol daun jeruk purut mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dengan hasil uji One Way ANOVA berbeda secara signifikan ($0,000 < 0,05$).

Kata kunci : Antibakteri ,Daun Jeruk Purut, Fraksi , *Propionibacterium Acnes*

Antibacterial Test of N-Hexane, Ethyl Acetate, and Water Ethanol Extract of Kaffir lime Leaves Against *Propionibacterium Acnes*

Abstract

Acne is an inflammation of the sebaceous follicle glands, one of the causes is a bacterial infection. Kaffir lime leaves can be used as an antibacterial because they contain essential oils, alkaloids, flavonoids, saponins, tannins and terpenoids. This study aims to determine the antibacterial activity of the n-hexane, ethyl acetate and water ethanol extract of kaffir lime leaves against *Propionibacterium acnes* bacteria. Results of data analysis by One Way ANOVA test. The results showed the average inhibition zone of antibacterial activity in the positive control clindamycin 0.2% (27.78 ± 0.59), the negative control DMSO 10% (0) mm ; 10 % ethyl acetate fraction (18.8 ± 0.15) mm, 10 % n-Hexane (11.93 ± 0.33) mm, and 10 % water fraction (10.2 ± 0.34) mm. The conclusion is that the ethanol extract fraction of kaffir lime leaves has antibacterial activity significantly different ($0.000 < 0.05$) against *Propionibacterium acnes*.

Keywords: *Antibacterial, Lime leaves, Fraction, Propionibacterium Acnes*

Pendahuluan

Jerawat adalah reaksi peradangan kelenjar *folikel sebaceous* ditandai dengan munculnya komedo, papula, pustula, nodul dan jaringan parut (Kabau, 2012). Prevalensi tertinggi terjadi pada wanita usia 14-17 tahun sebesar 83-85 % sedangkan pada laki-laki usia 16-19 tahun adalah 95 – 100 % (Afriyanti, 2015). Jerawat bisa diobati dengan antibiotik seperti antibiotik sistemik doksisisiklin, dan azitromisin, serta antibiotik topikal tetrasiklin, dan klindamisin (Mohamed et al, 2015).

Tanaman obat yang dapat dijadikan alternatif antibakteri untuk jerawat yaitu tumbuhan jeruk purut yang diambil pada bagian daunnya. Daun jeruk purut mengandung tanin 1,8 %, steroid, triterpenoid, dan minyak esensial 1 – 1,5 %. Kulit jeruk purut mengandung saponin, tanin dan minyak atsiri 2 – 2,5 %. Daun jeruk purut juga digunakan sebagai bahan utama obat tradisional. Daun jeruk purut mengandung alkaloid, polifenol, minyak atsiri, tanin, flavonoid. Daun Jeruk purut memiliki efek farmakologis sebagai antiseptik dan antioksidan. Senyawa yang terkandung dalam daun jeruk purut yang berfungsi sebagai antibakteri adalah: alkaloid, flavonoid, dan tanin (Miftahendrawati, 2014).

Menurut penelitian Astriani dkk (2021) konsentrasi ekstrak etanol daun jeruk purut yang digunakan adalah 2,5 %; 5 %; 7,5 %; dan 10 %. KHM diperoleh pada konsentrasi 5 %. Ekstrak daun jeruk purut mempunyai efek antibakteri, semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun jeruk purut maka zona hambat semakin luas.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) yang telah dilakukan oleh Hudawali (2021) dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 96 % daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium Acnes* dengan zona hambat diperoleh pada konsentrasi 75 % (32,66 ± 0,57) mm (sangat kuat), pada konsentrasi 50 % (24 ± 1,73) mm (sangat kuat), pada konsentrasi 25 % (18,66 ± 0,57) (kuat).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan pengujian lebih lanjut untuk meneliti terkait fraksi ekstrak etanol daun jeruk purut dengan metode Kromatografi Cair Vacum (KCV) apakah juga memiliki aktivitas antibakteri, dalam hal ini bakteri uji yang akan digunakan adalah *Propionibacterium Acnes*.

Metode Penelitian

Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental dilaboratorium yaitu untuk menetaui aktivitas antibakteri fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dengan metode Kromatografi Cair Vacum (KCV) dari ekstrak etanol daun jeruk purut terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan metode difusi agar.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas (pyrex), cawan petri (normax), mikropipet (Dragon onemed), blender (Maspion), autoklaf (GEA), blender (maspion), inkubator (memmert), jarum ose (lokal), lemari pendingin (Toshiba), timbangan (acis), neraca analitik (acis), *laminar air flow* (Biobase), *oven* (memmert), pinset (lokal), lampu Bunsen (lokal), *rotary evaporator* (bio base), dan satu set alat Kromatografi Cair Vakum (KCV).

Bahan

Bahan digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut (*Citrus Hystrix* DC). Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Propionibacterium acnes*,

dan bahan lain yaitu etanol 96% (Merck), aquadest (klins), n-Heksana PA (Teknis), etil asetat (Teknis), HCl, larutan mayer, larutan Dragendrof, HCl pekat, FeCl₃, kloroform, H₂SO₄ pekat, asam asetat anhidrat, dimethylsulfoksida (DMSO) (Merck), NA (*Nutrient Agar*) (Merck), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Merck), NaCl 0,9% steril, kertas saring (lokal), kertas perkamen (lokal), kapas steril (lokal).

Ekstraksi

Ekstrak dibuat dari serbuk daun jeruk purut yang diperoleh sebanyak 2,4 kg kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5 selama 8 hari pada suhu ruang dengan proses pengadukan setiap 1x24 jam. Kemudian dipekatkan dalam *rotary evaporator* pada temperatur 65 °C, kemudian ekstrak diuapkan dengan waterbath hingga didapat ekstrak kental (Melani,2020).

Fraksinasi

Fraksinasi menyiapkan alat KCV, kemudian ditimbang silika gel 60 sebanyak 20 gram dimasukkan kedalam kolom sampai 2/3 tinggi kolom sambil pompa vakum dijalankan. Permukaan ditekan sampai terbentuk lapisan yang cukup padat. Selanjutnya pelarut yang mempunyai kepolaran rendah (n-heksana) dituangkan kedalam kolom dan pompa dihidupkan. Setelah pelarut terisap hingga kering maka kolom siap digunakan.

Ditimbang ekstrak 10 gram dan dimasukkan sisa silikagel 60, kemudian dicampurkan sedikit demi sedikit hingga didapat ekstrak kering yang muda mengalir. Selanjutnya dituangkan kedalam kolom dengan merata dan permukaan kolom ditutup aluminium foil. Pelarut dituangkan kedalam kolom dari tingkat kepolaran rendah ke tinggi yaitu 100 mL n-heksana kemudian dihidupkan pompa dihisap hingga kering, setelah itu hasil fraksi diletakkan di cawan. Kemudian dilanjutkan dengan etil asetat 100 mL dituangkan kedalam kolom, dihisap hingga kering dan diletakkan pada cawan. Terakhir pelarut air dituangkan kedalam kolom, dihisap hingga kering dan hasil fraksi diletakkan di cawan. Ketiga fraksi yang didapat dilakukan pemekatan dengan waterbath pada temperatur 50 °C hingga diperoleh fraksi yang kental.

Identifikasi Minyak Atsiri

Meneteskan sampel pada kertas saring. Positif mengandung minyak atsiri apabila bekas penetesan tidak meninggalkan noda. Minyak atsiri memiliki titik didih rendah sehingga mudah menguap pada suhu kamar (Rini et al., 2017).

Identifikasi Alkaloid

Sampel dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Tabung ditetesi HCl 0,5 N dan pereaksi mayer, apabila mengandung alkaloid maka ditandai adanya endapan kuning. Tabung ditetesi HCl 0,5 N dan pereaksi dragendroff, apabila endapan berwarna jingga maka mengandung alkaloid (Lany Indrayani, 2006).

Identifikasi Flavonoid

Sampel sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,5 mg. Selanjutnya ditambahkan HCl pekat 3-5 tetes, positif flavonoid ditunjukkan dengan adanya warna orange, merah, hitam, hijau, dan jingga (Kursia et al., 2016).

Identifikasi Saponin

Sampel sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL aquades hangat atau panas dikocok dan diamkan selama 5 menit. Apabila busa tidak hilang maka tambahkan HCl 2 N, jika masih ada busa yang stabil maka positif saponin (Harborne, 2006).

Identifikasi Tanin

Sampel sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditetesi dengan 3 tetes FeCl_3 . Positif tanin ditandai dengan adanya warna hijau kehitaman atau biru (Kursia et al., 2016).

Identifikasi Terpenoid

Sampel diuapkan hingga kering, setelah itu residu yang didapatkan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat. Selanjutnya campuran ditetesi dengan 2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung. Positif triterpenoid ditunjukkan dengan warna merah atau violet dan positif terpenoid ditunjukkan dengan warna hijau kebiruan (Harborne, 2006).

Pembuatan Konsentrasi Fraksi

Fraksi yang telah dikentalkan kemudian dilakukan pembuatan berbagai konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10%. Pelarut yang digunakan untuk mengencerkan fraksi kental adalah DMSO 10%. Konsentrasi 2,5% dibuat dengan menimbang 0,025 gram fraksi kental ekstrak etanol daun jeruk purut kemudian ditambah dengan DMSO 10% sebanyak 1 mL. Konsentrasi 5% dibuat dengan menimbang 0,05 gram fraksi kental kemudian ditambah DMSO 10% sebanyak 1 mL. Konsentrasi 10% dibuat dengan menimbang 0,1 gram fraksi kental kemudian ditambah DMSO 10% sebanyak 1 mL (Setyaningrum, 2021).

Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan pada semua peralatan yang akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini. Alat-alat gelas disterilkan di oven dalam temperatur 170 °C selama 1 jam. Media disterilkan di autoklaf dalam temperatur 121 °C selama 15 menit. Jarum ose dan pinset disterilkan kembali sebelum digunakan dan sesudah digunakan dalam melakukan uji antibakteri di atas lampu bunsen (Maimunah dkk, 2020). sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* (Maimunah dkk, 2020).

Kultur bakteri *Propionibacterium acnes*

Bakteri *Propionibacterium acnes* yang sudah disuspensi dalam tabung reaksi kemudian diambil dengan kapas lidi steril, kemudian ditambahkan pada media NA (*nutrient agar*) dengan cara menggoreskan dengan kapas lidi steril yang berisi bakteri uji secara merata ke seluruh permukaan media. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 - 48 jam, diamati pertumbuhan bakterinya (Nugrahani, 2020).

Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah dimetilsulfoksida (DMSO) 10%, dikarenakan DMSO merupakan pelarut organik serta tidak memiliki sifat bakterisidal. Pernyataan tersebut menandakan bahwa DMSO tidak mempunyai aktivitas antibakteri, maka dapat dipastikan aktivitas antibakteri yang diperoleh tidak dipengaruhi secara langsung oleh DMSO (Amalia et al., 2016).

Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu antibiotik klindamisin 0,2%. Zat ini dibuat dengan cara melarutkan 20 mg klindamisin ke dalam 10 mL akuades (Setyaningrum, 2021). Klindamisin memiliki sifat bakteriostatik, bekerja dengan menghambat pertumbuhan bakteri (Astika, Candra, dan Senja, 2020).

Uji Terhadap Bakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi pada media agar menggunakan kertas.

Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dibuat dengan menimbang sejumlah 3,8 gram kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades, bila perlu dengan bantuan pemanasan. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media MHA dituangkan pada cawan petri steril, didiamkan pada suhu kamar hingga memadat.

Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 2,8 gram *Nutrient Agar* dilarutkan pada 100 mL aquades dan dipanaskan diatas hot plate. Sterilkan di autoklaf dalam waktu 15 menit pada temperatur 121 °C, kemudian dinginkan pada temperatur antara 45-50 °C. Menuangkan kedalam cawan petri sebanyak 15 mL, dihomogenkan dan dibiarkan memadat (Maimunah dkk, 2020).

Standar Kekeruhan (*Larutan Mc. Farland*)

Sebanyak 99,5 mL larutan asam sulfat 1% v/v dan 0,5 mL larutan barium klorida 1,175% b/v. Dicampurkan kedua larutan diatas dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan sampai homogen untuk memperoleh suspensi dengan tingkat kekeruhan yang sebanding dengan kekeruhan dari larutan standar *Mc. Farland*. (Maimunah dkk, 2020).

Suspensi Bakteri Uji

Bakteri *Propionibacterium acnes* dari biakan murni diambil 2-3 ose dan disuspensikan dengan NaCl 0,9%, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C. Pertumbuhan bakteri diamati hingga diperoleh kekeruhan yang cakram (*paper disc*). Uji aktivitas antibakteri dilakukan secara 3 kali replikasi. Kertas cakram dicelupkan kedalam sampel yaitu ekstrak etanol 96% daun jeruk purut dengan masing-masing konsentrasi fraksi, kontrol (positif dan negatif), kemudian diletakkan diatas media MHA yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji.

Inokulasi dilakukan dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Pengamatan hasil uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram. Antibiotik klindamisin sebagai kontrol positif digunakan sebagai pembanding yang dilihat zona hambatnya pada mikroba uji dan DMSO sebagai kontrol negatif (Maimunah dkk, 2020).

Hambatan

Pengukuran zona hambat di sekitar cakram dinyatakan dalam mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar cakram menunjukkan bahwa kandungan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) memiliki efek penghambatan terhadap *Propionibacterium acnes*. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan (Koeswardono, 1982). Luas zona hambatan yang terbentuk pada media diukur dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran zona hambat dilakukan untuk semua replikasi kemudian data yang diperoleh dihitung rata-rata (Maimunah dkk, 2020).

Tabel 1. Klasifikasi Respon Zona Hambat

Diameter zona hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
≥ 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

Hasil dan Pembahasan

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dalam penelitian ini dilakukan di Universitas Setia Budi Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Kecamatan Jebres, Kota Surakarta. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dari suku *Rutaceae* (C.A. Backer, 1963).

Ekstraksi

Hasil ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) terhadap *Propionibacterium acnes* dengan metode maserasi adalah sebagai berikut.

Tabel 2. Hasil Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut

Bobot Serbuk	Ekstrak	Rendemen
2455 gr	316,5 gr	12,9 % b/b

Hasil perhitungan rendemen pada tabel 2 menunjukkan bahwa serbuk kering daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) sebanyak 2455 gram menghasilkan ekstrak kental sebanyak 316,5 gram setelah melalui proses ekstraksi dengan rendemen ekstrak sebesar 12,9%.

Fraksinasi

Hasil ekstraksi daun jeruk purut berupa ekstrak cair digunakan sebanyak 40 gram untuk fraksinasi. Fraksinasi dilakukan dengan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV). Hasil fraksinasi masing-masing fraksi dapat dilihat pada Tabel 3 di bawah ini.

Tabel 3. Hasil fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut

Berat Ekstrak (gram)	Fraksi	Berat Fraksi (gram)	Persentase Berat Fraksi (%)	One Sample T-Test
40	n-heksana	3,7	9,2	0,04
	Etil Asetat	4,68	11,7	
	Air	6,3	15,75	

Keterangan:

Uji *One sample t-test* p value <0,05 (ada perbedaan data yang signifikan)

Uji Pendahuluan Fraksi

Hasil uji pendahuluan fraksi ekstrak etanol 96 % daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang digunakan dalam penelitian ini yaitu uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) terhadap *Propionibacterium acnes* adalah positif mengandung minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan terpenoid yang ditandai dengan perubahan warna. Hasil reaksi dapat dilihat pada tabel 4.

Uji pendahuluan minyak atsiri dilakukan dengan meneteskan sampel pada kertas saring. Apabila setelah penetesan pada kertas saring tidak meninggalkan bekas noda maka dapat disimpulkan bahwa fraksi mengandung minyak atsiri karena minyak atsiri adalah senyawa yang mudah menguap bahkan pada suhu kamar (Gunawan & Mulyani, 2004).

Tabel 4. Hasil Uji Pendahuluan Fraksi

Uji	Sampel		
	Fraksi n-heksana	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Air

Minyak atsiri	+	+	-
Alkaloid	+	++	-
Flavonoid	+	++	+
Saponin	+	-	+
Tanin	-	+	+
Terpenoid	+	++	+

Keterangan :

(+): Hasil positif mengandung senyawa metabolit

(-): Hasil negatif mengandung senyawa metabolit

Fraksi n-heksana dan air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) positif mengandung minyak atsiri yang ditandai dengan pengujian terhadap kertas saring tidak meninggalkan bekas noda karena sifat dari minyak atsiri mudah menguap, sedangkan Fraksi etil asetat negatif mengandung minyak atsiri.

Skrining fitokimia kandungan senyawa alkaloid dalam penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi n-heksana, etil asetat dan air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) positif mengandung senyawa alkaloid yang ditunjukkan dengan adanya endapan setelah sampel direaksikan dengan pereaksi Mayer dan Dragendoff.

Uji flavonoid dilakukan dengan penambahan logam Mg dan HCl pekat adalah untuk memutus ikatan glikosida melalui reduksi ikatan inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium berwarna merah atau jingga. Flavonoid yang sudah bebas, kemudian ditarik oleh amil alkohol, sehingga amil alkohol yang mulanya tidak berwarna menjadi berwarna jingga pada akhir reaksi. (Ergina *et al.*, 2014). Hasil positif suatu ekstrak mengandung senyawa flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna yang terjadi menjadi warna kuning, hijau, hitam, jingga dan oranye (Kursia *et al.*, 2016).

Uji kualitatif saponin dalam fraksi dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan air. Busa yang timbul setelah penambahan air dan pengocokan disebabkan karena saponin mengandung senyawa yang sebagian larut dalam pelarut polar atau hidrofilik dan senyawa yang larut dalam pelarut non polar atau hidrofobik. Senyawa aktif saponin merupakan senyawa yang memiliki gugus polar dan non polar bersifat aktif permukaan sehingga saat saponin dikocok dengan pelarutnya dapat membentuk misel. Struktur misel terjadi karena gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus non polarnya menghadap ke dalam, maka dari itu terlihat seperti busa (Robinson, 1995). Timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya kandungan senyawa saponin dalam sampel. Hasil pengujian fraksi n-heksana, air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) positif mengandung senyawa saponin sedangkan fraksi etil asetat negatif.

Uji kandungan senyawa tanin fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dilakukan dengan prinsip kerja penambahan pereaksi FeCl₃ pada sampel. Fraksi n-Heksana negatif tanin sedangkan fraksi etil asetat dan air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) positif mengandung senyawa tanin yang ditunjukkan dengan perubahan warna sampel menjadi hitam kebiruan.

Uji kualitatif yang dilakukan terhadap senyawa terpenoid dalam ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dilakukan dengan pereaksi kloroform, asam asetat dan H₂SO₄ pekat. Hasil positif pada pengujian triterpenoid berupa cincin warna hijau kebiruan menunjukkan adanya terpenoid (Lany Indrayani, 2006).

Uji Aktivitas Antibakteri

Tahap awal yang dilakukan pada uji aktivitas antibakteri yaitu mempersiapkan sampel uji untuk pengujian aktivitas antibakteri yaitu dengan dilakukan pengenceran

fraksi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dalam 3 variasi konsentrasi 2,5%, 5% dan 10% yang akan dibandingkan dengan ekstrak, klindamisin 0,2% sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Klindamisin digunakan sebagai kontrol positif karena klindamisin merupakan tolak ukur yang baik untuk menentukan kemampuan fraksi dalam menghambat bakteri. Klindamisin sebagai antimikroba yang bersifat bakteriostatik maupun bakterisida yang mempunyai mekanisme membunuh bakteri dengan cara mencegah sintesis protein dari bakteri (Novaryatiin *et al.*, 2018). Kontrol negatif yang digunakan adalah dimetilsulfoksida (DMSO) 10% yang merupakan jenis pelarut universal yang tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga penggunaan pelarut DMSO tidak mempengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri (Trisia *et al.*, 2018).

Tahap selanjutnya dilakukan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* pada NaCl 0,9% untuk membiakkan bakteri uji yang dibandingkan dengan larutan standar *Mc. Farland* untuk mengamati jumlah biakan bakteri uji yang dilihat dari kekeruhannya. Hasil suspensi bakteri berjumlah lebih dari 10^8 CFU/mL karena tingkat kekeruhan suspensi bakteri lebih keruh dari pada larutan standar *Mc. Farland*. Setelah itu dilakukan uji kemurnian bakteri dengan pengamatan morfologi koloni pada medium petri agar dari suspensi bakteri uji. Hasil dari uji kemurnian bakteri menunjukkan bahwa bakteri yang digunakan benar bakteri *Propionibacterium acnes* sesuai dengan penjelasan yang dikemukakan oleh Pramasanti (2008).

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri dari sampel uji yaitu fraksi dan ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan konsentrasi 2,5%, 5% dan 10% kontrol positif dan kontrol negatif terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Parameter kategori penghambatan antimikroba berdasarkan diameter zona hambat menurut Ambarwati (2007) pada kategori sangat kuat sebesar ≥ 20 mm, kategori kuat 10-20 mm, kategori sedang 5-10 mm dan kategori lemah ≤ 5 mm.

Tabel 5. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Sampel	Diameter Zona Hambat (mm)			Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
FN 10 %	11,9	12,3	12	11.93 \pm 0,33
FN 5 %	7,8	7,6	7,4	7.3 \pm 0,28
FN 2,5 %	5,4	5	5,8	5.3 \pm 0,42
FE 10 %	19	19,2	19,3	18.8 \pm 0,15
FE 5 %	13,3	13	13	13.23 \pm 0,28
FE 2,5 %	9	9,6	9,8	9.2 \pm 0,36
FA 10 %	10,4	10,2	10,6	10.2 \pm 0,34
FA 5 %	8	8	8,2	7.8 \pm 0,54
FA 2,5 %	5	4,7	4,9	4.6 \pm 0,45
Klindamisin 0,2% (b/v)	28,4	28	27,7	27.78 \pm 0,59
DMSO 10% (v/v)	0	0	0	0 \pm 0

Keterangan:

FN : Fraksi n-heksana

FE : Fraksi Etil Asetat

FA : Fraksi Air

Berdasarkan hasil penelitian, kontrol positif klindamisin 0,2% mempunyai aktivitas antibakteri sangat kuat terhadap *Propionibacterium acnes* yang ditunjukkan dengan hasil zona hambat masing-masing sebesar (27,78 \pm 0,59) mm. Sedangkan fraksi ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang mempunyai aktivitas antibakteri tergolong kuat terhadap *Propionibacterium acnes* yang ditunjukkan dengan

zona hambat pada fraksin-Heksana 10 % ($11.93 \pm 0,33$) mm, fraksi etil asetat 10 % ($18,8 \pm 0,15$) mm, fraksi etil asetat 5 % ($13,23 \pm 0,28$) mm, fraksi air 10% ($10,2 \pm 0,34$) mm. Aktivitas antibakteri tergolong sedang dihasilkan oleh n-heksana 5 % ($7,3 \pm 0,28$) mm, fraksi etil asetat 2,5 % ($9,2 \pm 0,36$) mm, fraksi air 5 % ($7,8 \pm 0,54$) mm. Sedangkan fraksi n-Heksana 2,5 % ($5,3 \pm 0,42$) mm dan fraksi air 2,5 % ($4,6 \pm 0,45$) mm memiliki zona hambat lemah serta tidak terbentuk zona hambat pada kontrol negatif. Pada kontrol negatif terbukti tidak terdapat zona hambat karena DMSO merupakan pelarut organik dan tidak bersifat bakterisidal sehingga tidak memiliki aktivitas antibakteri (Khoirunnisa et al., 2012).

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini semakin besar konsentrasi semakin besar aktivitas antibakteri, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi yang paling efektif adalah konsentrasi 10% fraksi ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) ditunjukkan dengan diameter zona hambatnya lebih tinggi daripada konsentrasi 5% dan 2,5% namun lebih kecil dari diameter zona hambat yang dihasilkan oleh kontrol positif klindamisin 0,2%. Efek antibakteri fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dihasilkan dari kandungan senyawa didalamnya yaitu minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan terpenoid. Selain itu menurut Laili (2017) daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) juga telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri dengan kandungan sitronelal dalam minyak atsiri jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) pada daun sebesar 85,07% dan menurut Dhavesia (2017) yang menyatakan bahwa daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) mengandung senyawa alkaloid dan tanin yang berfungsi sebagai antibakteri.

Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri lebih besar dibandingkan dengan fraksi n-Heksana dan air, hal ini dikarenakan pelarut etil asetat adalah pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa bioaktif yang bersifat polar dan non polar sekaligus (Lingga et al., 2016). Fraksi etil asetat juga memiliki potensi lebih besar dalam menghambat aktivitas antibakteri dibandingkan dengan ekstrak etanol karena fraksi etil asetat mengandung senyawa antibakteri yang mampu menghambat dan membunuh bakteri lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol. Senyawa yang bertanggung jawab sebagai antibakteri yaitu sitronelal, linalol, isopulegol, β -sitronelol, geraniol asetat, sitronelil asetat, kariofilen, nerolidol, dietil karbitol, eriocitrin, hesperidin, dan neoponcirin (Thomas et al., 2022).

Analisis Data

Hasil analisa data sampel uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksana, etil asetat dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) terhadap *Propionibacterium acnes* yang meliputi uji normalitas (*saphiro wilk*) uji homogenitas (*Levene test*) dan uji perbedaan dari setiap sampel dengan *One-Way* ANOVA dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil Analisis Data *One Way* ANOVA

Sampel	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)	Normalitas	Homogenitas	ANOVA
FN 10%	$11.93 \pm 0,33$			
FN 5 %	$7.3 \pm 0,28$			
FN 2,5 %	$5.3 \pm 0,42$			
FE 10 %	$18.8 \pm 0,15$			
FE 5 %	$13.23 \pm 0,28$	0,06	0,267	0,00
FE 2,5 %	$9.2 \pm 0,36$			
FA 10 %	$10.2 \pm 0,34$			
FA 5 %	$7.8 \pm 0,54$			
FA 2,5 %	$4.6 \pm 0,45$			
Klindamisin 0,2% (b/v)	$27.78 \pm 0,59$			

DMSO 10% (v/v)	0 ± 0
----------------	-------

Keterangan:Uji Normalitas p *value* > 0,05 (data terdistribusi normal)Uji Homogenitas p *value* > 0,05 (data homogen)Uji *One Way* ANOVA p *value* < 0,05 (ada perbedaan data yang signifikan)

FN : Fraksi n-heksana

FE : Fraksi Etil Asetat

FA : Fraksi Air

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri yang dilakukan pada semua sampel uji dilakukan analisis data statistik dengan uji *One Way* ANOVA. Tahap awal dilakukan uji normalitas menggunakan pengujian Uji *Saphiro wilk* yang bertujuan untuk menguji normalitas distribusi nilai sampel yang diamati. Uji *Sapiro wilk* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Distribusi data dikatakan normal karena hasil menunjukkan nilai p (*Asymp. Sig.*) $0,06 > p = 0,05$. Pengujian dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan uji *Levene test* yang bertujuan untuk menguji keseragaman nilai sampel yang diamati. Uji *Levene test* menunjukkan bahwa data sampel homogen yang berarti terdapat keseragaman nilai sampel. Distribusi data dikatakan homogen karena hasil menunjukkan nilai signifikansi $0,267 < p = 0,05$. Data zona hambat kemudian di analisis dengan *One Way* ANOVA untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar sampel yang di uji. Prinsip uji *One Way* ANOVA adalah melakukan analisis variabilitas data dengan syarat data tersebut harus terdistribusi normal dan homogen. Masing-masing perlakuan dilakukan uji *One Way* ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan penyebaran data. Hasil uji *One Way* ANOVA didapatkan nilai signifikansi $0,000 < p = 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan aktivitas antibakteri yang signifikan antar sampel uji.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C) dapat ditarik kesimpulan bahwa zona hambat rata-rata aktivitas antibakteri pada kontrol positif klindamisin 0,2 % sebesar $(27,78 \pm 0,59)$ dan kontrol negatif DMSO 10 % (0) mm ; fraksi etil asetat sebesar 10 % $(18,8 \pm 2,5)$ mm, 5 % $(9,2 \pm 0,36)$ mm ; n-Heksana 10 % sebesar $(11,93 \pm 0,33)$ mm, 5 % $(7,3 \pm 0,28)$ mm, 2,5 % $(5,3 \pm 0,42)$ mm ; dan fraksi air 10 % sebesar $(10,2 \pm 0,34)$ mm, 5 % $(7,8 \pm 0,54)$ mm, 2,5 % $(4,6 \pm 0,45)$ mm. Hasil analisis data statistic *One Way* ANOVA menunjukkan data sampel berbeda secara signifikan ($0,000 < 0,05$)

Ucapan Terimakasih

Saya ucapkan terimakasih kepada semua pihak yang bersangkutan. Terutama dosen pembimbing saya Fadilah Qonitah, S.Pd., M.Sc dan apt. Ahwan, S.Farm., M.Sc yang telah memberikan arahnya. Terimakasih kepada laboratorium Univeristas Sahid Surakarta yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini. Terimakasih kepada teman teman yang telah membantu saya.

Daftar Pustaka

- Afriyanti, R.N. (2015), *Akne Vulgaris Pada Remaja*. Jurnal Majority Vol 4: No 6.
- Ambarwati, Risa (2007). *Ekstrasi Bionutrein Dari Tanaman MHR Dan Aplikasinya Pada Tanaman Caisin*. Skripsi Sarjana Pada FPMIPA UPI Bandung: tidak diterbitkan.
- Astika, W. D., Candra, P. R. dan Senja, S., (2020), *Uji Daya Hambat Ekstrak Kulit Nanas (Ananas Comosus L) Jenis Smooth Cayenne dan Queen Terhadap Bakteri Streptococcus Mutans Penyebab Karies Gigi*, Analis Farmasi, 5(1), Pp. 10–17.
- Backer, C. A. Dan B. V. D. Brink. (1963). *Flora Of Java Vol. I. N.V.P Noordhoff*

Groningen the Netherlands

- Harborne, J.B. (1987), *Metode Fitokimia*. kedua. Bandung: ITB.
- Hudawali, D., (2021), *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut (Citrus Hystrix D. C.) Terhadap Propionibacterium Acnes*, Skripsi, Program Studi Farmasi Universitas Sahid Surakarta
- Komang, Mirah Meigaria & I Wayan Mudianta, (2016) *Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Aseton Daun Kelor (Moringa Oleifera)* Jurusan Analis Kimia FMIPA Universitas Pendidikan Ganesha
- Kursia, S., Lebang, J. S., Taebe, B., Burhan, A., Rahim, W. O., & Nursamsiar (2016), *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etilasetat Daun Sirih Hijau (Piper betle L.) terhadap Bakteri Staphylococcus epidermidis*, Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology.
- Lany Indrayani, Hartati Soetjipto, dan L. S., (2006), *Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (Stachytarpheta Jamaicensis L. Vahl) Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach*
- Maimunah, Siti dkk. (2020), *Antibacterial Activity Extract of Leaves of Kaffir Lime (Citrus Hystrix DC) Againsts of Staphylococcus Aureus Bacteria Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Purut (Citrus Hystrix DC) Terhadap Bakteri Staphylococcus Aureus*.6 (September): 129–38.
- Melani, I. R. A. R., (2020), *Potensi Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Purut (Citrus hystrix) terhadap Pertumbuhan Bakteri Shigella dysenteriae secara IN VITRO (Citrus hystrix)*, Skripsi, Universitas Islam Negeri
- Maulana Malik Ibrahim Malang, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, p. 17.
- Robinson, T., (1995), *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, Edisi VI, Hal 191-216, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung.
- Setyaningrum, D. A., (2021), *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut (Citrus Hystrix D. C.) Terhadap Staphylococcus Epidermidis*, Skripsi, Program Studi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.
- Thomas, A., Rusmana, D., dan Evacuasiy, E., (2022). *Bakteri Staphylococcus Aureus*.6 (September): 129–38.