



Study Efektivitas Ekstrak Kental Kulit Buah Jeruk Purut Terstandar (*Citrus hystrix*) Sebagai Antioksidan dan Antijerawat

Farida Lanawati Darsono¹, Lisa Soegianto¹, Maria Anabella Jessica^{*1}

^{1,2,3}. Prodi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Indonesia

INFO ARTIKEL

A B S T R A K

Sejarah artikel:

Penerimaan naskah: 13 Agustus 2022
Penerimaan naskah revisi: 01 Desember 2022
Disetujui untuk dipublikasikan: 02 Desember 2022

Kata kunci :

antijerawat;
antioksidan; *Citrus hystrix*; ekstrak kulit buah jeruk purut, standarisasi.

Salah satu gangguan di permukaan kulit wajah yaitu jerawat yang disebabkan oleh *Propionibacterium acnes*. Perlakuan jerawat bisa secara oral atau topikal yang umumnya mengandung antibiotika yang lebih efektif mengatasi jerawat, sedangkan kelemahannya mudah terjadi resistensi bakteri terhadap antibiotik. Salah satunya yang potensial dikembangkan sebagai antijerawat dan antioksidan yaitu limbah dari kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*). Senyawa aktif dalam kulit jeruk purut yang memiliki efek antibakteri: alkaloid, flavonoid (naringenin dan hesperidin), dan tanin. Efek sebagai antioksidan, analgesik, dan antiinflamasi ditunjukkan dari kandungan senyawa fenoliknya. Ekstrak kental terstandar yang diperoleh dengan metode ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut penyari 96% memiliki rendemen sebesar $17,59 \pm 1,70$ %. Konsentrasi ekstrak kental jeruk purut yang digunakan dalam penelitian ini antara 10% - 20%. Dalam rangka penjaminan mutu ekstrak maka dilakukan proses standarisasi secara spesifik dan non spesifik selanjutnya dilakukan uji efektivitas yang terdiri dari aktivitas antioksidan dengan parameter IC_{50} menggunakan metode DPPH sedangkan antibakteri dilakukan dengan menggunakan parameter Daerah Hambat Pertumbuhan – DHP secara difusi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi sediaan gel ekstrak kental jeruk purut (10%, 15%, dan 20%) terhadap efektivitasnya serta korelasi antara peningkatan aktivitas antioksidannya dengan antijerawatnya (antibakterinya). Berdasarkan hasil percobaan ekstrak kulit buah jeruk purut terbukti memiliki daya antioksidan, dimana dengan peningkatan konsentrasi diikuti dengan penurunan nilai IC_{50} yaitu 2,49 mg/mL. Nilai DHP ekstrak kulit buah jeruk purut untuk masing-masing konsentrasi 10%, 15% dan 20% berurutan sebesar $15,58 \pm 0,287$ mm, $17,45 \pm 0,319$ mm, $18,27 \pm 0,306$ mm, dimana semakin meningkat konsentrasi ekstrak maka efek sebagai antijerawat juga meningkat. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka disimpulkan ekstrak kulit jeruk purut berpotensi sebagai antioksidan dan antijerawat.

Effectiveness Study of Standardized Kaffir Citrus (*Citrus hystrix*) Fruit Peel Extract as an Antioxidant and Anti-Acne Agent

Keywords:

antiacne;
antioxidant; Citrus hystrix; kaffir lime fruit peel extract, standardization

A B S T R A K

One of the disorders on the surface of facial skin is acne caused by *Propionibacterium acnes*. The treatment of acne can be oral or topical, which generally contains antibiotics that are more effective in dealing with acne. The drawback is that bacterial resistance to antibiotics quickly occurs. Kaffir lime fruit peel waste (*Citrus hystrix*) is one of the natural ingredients that has antioxidant and antibacterial effects that have the potential to be developed as an anti-acne product. The active compounds in kaffir lime fruit peels which antibacterial effects: alkaloids, flavonoids (naringenin and hesperidin), and tannins. The effect as an antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory is shown from the content of phenolic compounds. The standardized viscous extract obtained by the maceration extraction method using a 96% solvent yielded $17.59 \pm 1.70\%$. The kaffir lime fruit peels extract concentration used in this study was between 10% - 20%. To guarantee the quality of the extract, a specific and non-specific standardization process was carried out, then an effectiveness test was carried out, which consisted of antioxidant activity with the IC_{50} parameter using the DPPH method. In contrast, antibacterial was carried out using the Diffusion Inhibited Growth Area – DHP parameter. This study aimed to determine the effect of increasing the concentration of kaffir lime fruit peels viscous extract gel (10%, 15%, and 20%) on its effectiveness and the correlation between increased antioxidant activity and anti-acne (antibacterial). Based on the experimental results of kaffir lime peel extract, it was proven to have antioxidant power, increasing the concentration by decreasing the IC_{50} value of 2.49 mg/mL. The DHP values of kaffir lime fruit peel extract for each concentration of 10%, 15%, and 20% were 15.58 ± 0.287 mm, 17.45 ± 0.319 mm, 18.27 ± 0.306 mm, where the increasing concentration of the

* Corresponding author: Maria Anabella Jessica, Prodi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Indonesia . E-mail: marbel@ukwms.ac.id

extract as an anti-acne also increased. Based on the results of these studies, it was concluded that kaffir lime fruit peel extract has the potential as an antioxidant and anti-acne.

1. Pendahuluan

Salah satu gangguan di permukaan kulit wajah yaitu jerawat yang disebabkan oleh *Propionibacterium acnes*. Kasus jerawat paling sering ditemukan pada remaja terutama yang memasuki fase pubertas hingga usia dewasa muda, dan kondisi ini dipengaruhi pula faktor seperti perubahan hormon, faktor genetik atau keturunan, stres, dan komedo. Kulit yang sensitif lebih rentan ber-jerawat. Jerawat merupakan suatu kondisi wajah dengan pori-pori kulit tersumbat akibat produksi minyak (sebum) berlebih. Jerawat terjadi ketika folikel rambut atau tempat tumbuhnya rambut tersumbat oleh minyak dan sel kulit mati. Hal tersebut menyebabkan peradangan serta penyumbatan pada pori-pori kulit. Peradangan ini ditandai dengan munculnya benjolan kecil yang terkadang berisi nanah di atas kulit. Gangguan kulit ini dapat terjadi di bagian tubuh dengan kelenjar minyak terbanyak, yaitu di wajah, leher, bagian atas dada, dan punggung (1).

Jerawat bisa diatasi dengan pengobatan secara oral atau topikal yang umumnya mengandung antibiotika (doksisisiklin, klindamisin, benzoil peroksida, asam azelat dan retinoid). Kelebihan penggunaan obat antibiotik oral maupun topikal yaitu lebih efektif mengatasi jerawat, sedangkan kelemahannya mudah terjadi resistensi bakteri terhadap antibiotik seperti iritasi. Selain itu, ditemukan juga peningkatan prevalensi bakteri *Propionibacterium acnes* yang resisten terhadap antibiotik klindamisin dari 45% menjadi 91% dan antibiotik tetrasiklin dari 5% menjadi 26,4% (2,3).

Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan pengembangan produk sediaan antijerawat berbahan alam yang diharapkan efektif dan lebih ramah terhadap kulit wajah dengan resiko resistensi antibiotik dapat dihindari. Salah satunya yang potensial dikembangkan sebagai antijerawat yaitu buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) memiliki

kandungan yang berfungsi sebagai antibakteri adalah alkaloid, flavonoid (naringenin dan hesperidin), dan tanin (4). Bagian dari buah jeruk yang akan digunakan digunakan yaitu kulitnya. Bentuk ekstrak yang dipilih yaitu ekstrak kental dengan metode maserasi menggunakan pelarut penyari etanol 96%. Pemilihan penyari etanol 96% mengacu dari sifat fisika kimia dari kandungan senyawa aktif berkhasiat dalam kulit buah jeruk purut yang bersifat polar, serta memiliki sifat toksisitas yang rendah (5). Kandungan zat berkhasiat dalam jeruk purut meliputi golongan fenolik dan flavonoid. Pada bagian kulit jeruk, senyawa yang merupakan golongan metabolit sekunder utama adalah senyawa golongan flavonoid (6). Golongan flavonoid meliputi flavon/flavonol, flavanon, kumarin, β -pinene, limonene, sabinene, citronellal, terpinen-4-ol, citronellol, linalool, molase, pektin, citronellal, linalool, citronellol, terpinen-4-ol, iso Pulegol, dan α -cubebene (7,8). Sedangkan jenis flavon yang paling banyak dikandung dalam kulit buah jeruk purut yaitu naringenin dan hesperidin (9,10,11). Kuantitas kandungan berbagai metabolit sekunder tersebut dipengaruhi oleh proses dan waktu pemanenan yang mana

direkomendasikan terbaik pada saat buah masih belum matang ditandai dengan warna hijau dengan tekstur keras (12).

Potensial efek dari kulit buah jeruk purut yang telah banyak dilakukan penelitian yaitu sebagai antioksidan. Salah satunya oleh Ramli, Zaghlul, dan Nasir, 2020 menggunakan metode DPPH pada konsentrasi 100 mg/ml memberikan hasil 92,78%. Mengacu dari hasil penelitian tersebut maka perlu dieksplorasi lebih lanjut terkait dengan khasiat dari naringenin dan hesperidin untuk mengatasi jerawat dengan mekanisme kerjanya sebagai antioksidan dalam bentuk sediaan kosmetika untuk tujuan perawatan kulit yaitu antijerawat.

Berdasarkan hal tersebut, maka dirasa perlu dilakukan upaya penelitian untuk peningkatan efektivitas penggunaan kulit buah jeruk purut dalam bentuk ekstrak kental sebagai antijerawat dan sebagai antioksidan. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi ekstrak kental kulit buah jeruk purut terhadap efektivitasnya serta korelasi antara peningkatan aktivitas antioksidannya dengan antijerwatnya (antibakterinya). Pemanfaatan kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang merupakan tanaman asli Indonesia sebagai produk kosmetika yang diharapkan mampu memberikan kontribusi pada penemuan terapi komplementer maupun alternatif untuk antijerawat.

2. Metode Penelitian

Bahan Baku Penelitian

Bahan Utama

Buah jeruk purut yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari pasar rakyat di sekitar Surabaya, dimana bahan baku ini sebelum digunakan akan dilakukan proses determinasi terlebih dahulu. Bagian yang akan digunakan berupa kulit dari buah yang belum matang.

Bahan Penunjang

Bahan penunjang meliputi reagen DPPH (Sigma Aldrich, USA), Etanol 96%, Metanol, CHCl₃ dengan kualitas pro analisis (pa) (Merck, Darmstadt, Germany), media Tryptic Soy Agar (Merck, Darmstadt, Germany), Plate KLT F254 (Merck, Darmstadt, Germany), bakteri *Propionibacterium acnes*.

Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi timbangan analitik (Sartorius tipe AL-500, Germany), pH meter (Methrom 620, Switzerland), viscometer Brookfield

(Synchro-Letic LVT, USA), Multiscan GO Microplate Reader (Thermoscientific, Finlandia), thermostatic waterbath (Mettmert, Germany), oven (Mettmert, Germany), alat-alat gelas dan alat penunjang lain.

Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Penyiapan Serbuk Sempul Kering Kulit Buah Jeruk Purut

Buah jeruk purut dipilih yang belum matang dengan ditandai kulit berwarna hijau dengan tekstur kasar, sebelum dipisahkan dari kulitnya akan dilakukan terlebih dahulu sortasi basah, setelah itu dilakukan pengupasan dan kulit yang diperoleh akan dikeringkan dalam oven dengan suhu sekitar 50°C. Kulit buah jeruk purut kering selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran dengan menggunakan blender dan serbuk diayak dengan mesh 100. Serbuk sempul kering selanjutnya dilakukan standarisasi dengan parameter spesifik (organoleptis bahan, dan pengamatan mikroskopis) dan parameter non spesifik (susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu larut air, dan kadar abu tidak larut asam (13,14).

Penyiapan Ekstrak Kental Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Penyiapan ekstrak kental kulit buah jeruk purut dengan cara ditimbang 500 gram, kemudian dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan pelarut etanol 96% sejumlah sama dan diaduk selanjutnya ditambahkan lagi etanol 96% sampai volume 1 L disimpan pada suhu ruang 25°C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan dan filtrat yang diperoleh dilakukan pemekatan dengan diuapkan di atas waterbath dengan suhu pemanasan yang tidak boleh melebihi titik didih air sampai diperoleh ekstrak kental. Persen rendemen dihitung terhadap volume ekstrak cair sebelum diuapkan. Ekstrak kental selanjutnya dilakukan standarisasi dengan parameter spesifik (organoleptis bahan, pH larutan ekstrak 1% b/v, profil zat berkhasiat secara KLT.) dan parameter non spesifik (susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu larut air, dan kadar abu tidak larut asam (13,14).

Penentuan Profil Senyawa Berkhasiat: naringenin dan hesperidin Dalam Ekstrak Kental Kulit Buah Jeruk Purut

Penentuan profil zat berkhasiat: naringenin dan hesperidin mengacu pada Dianingati dkk. (2015) secara kromatografi lapis tipis (KLT) yang dimodifikasi (15). Proses analisa menggunakan fase gerak: etil asetat: metanol: asam formiat (95:5:0,5 %v/v) dan fase diam : silika gel GF254. Sebagai larutan uji: larutan ekstrak kulit jeruk purut disiapkan dengan cara ditimbang 100 mg ekstrak kental dan dilarutkan dalam metanol ad 5 mL (20000 ppm)

dengan volume totalan 4 μ L. Sedangkan larutan pembanding digunakan naringenin dan hesperidin dengan konsentrasi 0,5% b/v dengan volume totalan sebesar 8 μ L; Noda yang terdeteksi diamati dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm dan ditentukan nilai Rf dari senyawa pembanding dan noda dari larutan ekstrak kulit jeruk purut.

Uji Efektivitas Ekstrak Kental Kulit Buah Jeruk Purut

Aktivitas Antioksidan Sediaan dengan metode DPPH dengan Spektrofotometer Microplate reader

Pembuatan Larutan DPPH 0,5 mM

Ditimbang 20 mg DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) dilarutkan dalam metanol hingga volume 100 mL (16).

Pembuatan Larutan Blanko Konsentrasi 40 μ g/mL

Larutan DPPH 0,5 mM (konsentrasi 200 ppm) dipipet sebanyak 5 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar dan diencerkan dengan methanol ad 25 mL (16).

Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum

Larutan DPPH konsentrasi 40 μ g/mL dihomogenkan dan diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm (16).

Pembuatan Larutan Uji

Sediaan gel masing-masing formula (F1, F2, dan F3) ditimbang sebanyak 10 gram dan dilarutkan dalam 10 mL campuran metanol pa kemudian dihomogenkan menggunakan vortex, disaring, dan diambil bagian larutan yang jernih. Penyiapan larutan kontrol terdiri dari 100 μ L larutan DPPH yang dicampur dengan 100 μ L metanol pa. Penyiapan larutan sampel terdiri dari larutan uji yang dicampur dengan larutan DPPH 0,5 mM pada perbandingan 1:1, yaitu dengan mengambil sebanyak 100 μ L larutan uji ke dalam 100 μ L larutan DPPH 0,5 mM. Penyiapan larutan blanko sampel terdiri dari 100 μ L larutan uji dan 100 μ L metanol pro analysis. Penyiapan larutan kontrol, larutan sampel, dan larutan blanko masing-masing dipipet ke dalam sumur 96-well plate dan direplikasi sebanyak 3 kali, kemudian diinkubasi dalam ruangan gelap pada suhu ruangan selama 45 menit dan diamati absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum terpilih. Selanjutnya berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan nilai %DPPH scavenging activity atau %inhibisi atau IC50 (17). Berdasarkan data yang diperoleh selanjutnya ditentukan korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak dalam sediaan terhadap peningkatan nilai %DPPH scavenging effect atau %inhibisi atau IC50 dengan parameter berupa nilai R hitung pada $\alpha = 0,05$ dan $df = 1$.

Antibakteri dengan Metode Difusi Sumuran

Pemeriksaan Bakteri *Propionibacterium acnes*

Makroskopis

Pengamatan makroskopis dilakukan dengan melakukan pengamatan terhadap bentuk, ukuran, warna, tepi, kenaikan permukaan dan tekstur koloni yang terbentuk pada media TSA (Tryptic Soy Agar).

Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram meliputi pengamatan terhadap bentuk, susunan sel dan reaksi Gram. Pewarnaan Gram dapat dilakukan dengan preparat ditetesi dengan larutan kristal violet modifikasi Hucker, dan diamkan selama 1 menit, setelah itu bilas dengan air kran, lalu dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan iodium Gram, dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan larutan alcohol : aseton (7 : 3) sampai larutan yang meninggalkan preparat tidak berwarna. Preparat dibilas dengan air kran lalu dikeringkan, dilakukan pewarnaan dengan menggunakan larutan Safranin Gram Stain, dan didiamkan 30 detik. Preparat dibilas dengan air kran kemudian dikeringkan dan diamati dengan mikroskop binokuler dengan perbesaran lensa 10 x 100.

Pembuatan Suspensi Bakteri

Propionibacterium acnes dalam TSA miring diambil 1 ose dan disuspensikan ke dalam TSB lalu diukur kekeruhannya dengan standar $\frac{1}{2}$ Mc Farland I ($\sim 1,5 \times 10^8$ CFU/mL).

Pembuatan Larutan Uji

Dibuat larutan uji 10%, 15%, dan 20% b/v dengan cara ditimbang 0,1 g; 0,15 g; dan 0,2 g ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*) kemudian masing-masing dilarutkan dalam 1 mL DMSO 1%.

Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi

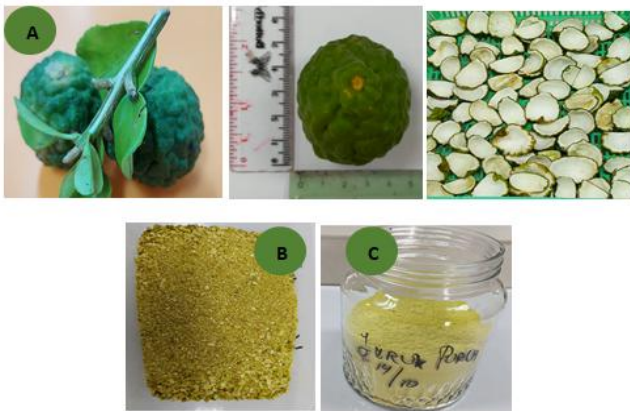
Suspensi bakteri yang sudah disetarakan dengan $\frac{1}{2}$ Mc Farland I ($\sim 1,5 \times 10^8$ CFU/ml) diinokulasikan sebanyak 0,1 mL ke dalam 10 mL TSA dan dituang ke dalam cawan petri steril, dihomogenkan. Kemudian dilakukan pra-pengeraman selama 1,5 - 2 jam pada suhu 37°C, lalu dilubangi dengan perforator berdiameter 6 mm. Ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*) dengan konsentrasi 10%, 15%, dan 20% dimasukkan ke dalam lubang sumuran sebanyak 20 μ L. Kontrol positif menggunakan antibiotik klindamisin dimasukkan 2 μ g/20 μ L ke dalam lubang sumuran. Kontrol negatif menggunakan DMSO 1% dimasukkan 20 μ L ke dalam lubang sumuran. Media diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah diinkubasi diamati area jernih disekeliling lubang yang

menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan mikroba. Diameter hambat pertumbuhan diukur menggunakan jangka sorong (18).

3. Hasil dan Diskusi

Hasil Pembuatan Serbuk Kering Simplisia Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Serbuk kering kulit buah jeruk purut yang diperoleh memberikan persen rendemen yang dihitung berdasarkan bobot simplisia kering nya yaitu sebesar $10,05 \pm 0,5$. Hasil pembuatan serbuk simplisia kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. (A) Buah jeruk purut segar; (B) Simplisia kering kulit buah jeruk purut, (C) Serbuk kering simplisia kulit buah jeruk purut (Koleksi Pribadi, 2022).

Hasil Pemeriksaan Standarisasi Serbuk Kering Simplisia Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Penjaminan kualitas serbuk kering simplisia kulit buah jeruk purut melalui tahapan uji standarisasi. Jenis standarisasi yang dilakukan meliputi non spesifik dan spesifik. Hasil pemeriksaan standarisasi serbuk simplisia kulit buah jeruk purut dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Standarisasi Serbuk Kering Simplisia Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Jenis Uji	Hasil Pengamatan
Standarisasi Spesifik	
Organoleptis	
Bentuk	Serbuk
Warna	Kuning kehijauan
Bau	Khas jeruk purut
Kadar Sari Larut Air ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$27,82 \pm 3,77$
Kadar Sari Larut Etanol ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$20,81 \pm 0,58$
Standarisasi Non Spesifik	

Kadar Air ($\bar{x} \pm SD$) (%) ($\leq 10\%$ (Departemen Kesehatan RI, 2008))	$8,89 \pm 0,89$
Kadar Abu Total ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$5,52 \pm 0,23$
Kadar Abu Tidak Larut Asam ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$0,61 \pm 0,001$
Kadar Abu Larut Air ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$5,17 \pm 0,13$

Hasil Pembuatan Ekstrak Kental Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Hasil pembuatan ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) diperoleh rata-rata rendemen yang dihitung berdasarkan bentuk berat serbuk simplisia kering-nya yaitu sebesar $17,59 \pm 1,70\%$ dan tampilan ekstrak dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) (Koleksi Pribadi, 2022)

Hasil Pemeriksaan Standarisasi Ekstrak Kental Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Standarisasi yang dilakukan meliputi non spesifik dan spesifik. Hasil pemeriksaan standarisasi ekstrak kental kulit buah jeruk purut dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Standarisasi Ekstrak Kental Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Jenis Uji	Hasil Pengamatan
Standarisasi Spesifik	
Organoleptis	
Bentuk	Kental
Warna	Hijau kekuningan
Bau	Khas Jeruk Purut
pH	$5,59 \pm 0,02$
Kadar Sari Larut Air ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$58,11 \pm 0,78$
Kadar Sari Larut Etanol ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$65,93 \pm 0,35$
Standarisasi Non Spesifik	
Kadar Air ($\bar{x} \pm SD$) (%) (5 – 30% (Voigt, 2000))	$17,82 \pm 0,86$
Kadar Abu Total ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$2,17 \pm 0,22$
Kadar Abu Tidak Larut Asam ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$0,04 \pm 0,001$
Kadar Abu Larut Air ($\bar{x} \pm SD$) (%)	$2,17 \pm 0,42$

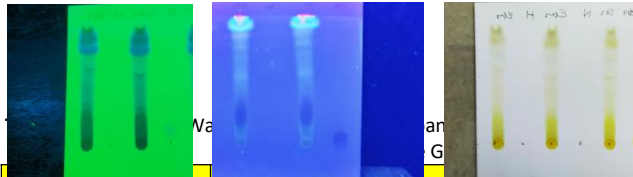
Hasil Penentuan Profil Zat Berkhasiat secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Pada Ekstrak Kental Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Penentuan profil zat berkhasiat asam ferulat dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT)

dengan fase diam plat *silica gel* 60 F254 dan fase gerak etil asetat: metanol : asam formiat (95 : 5 : 0,5) %v/v. Hasil penentuan profil zat berkhasiat hesperidin, naringin serta rutin dalam ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) dapat dilihat pada **Gambar 3** dan **Tabel 3**.

REN EHE REN EHE REN EHE

Gambar 3. Profil noda perbandingan hesperidin, naringin, rutin dan ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada pengamatan dibawah sinar UV 254 nm (A), sinar UV 366 nm (B) dan sinar tampak (C) dengan penampakan noda FeCl₃ dengan urutan penotolan : R = rutin, E = ekstrak kental kulit buah jeruk purut, N = naringin, H = hesperidin.



Metode Analisis	Pengamatan	Noda Ke :	Harga Rf			
			Ekstrak	Standar		
				Rutin (R)	Naringin (N)	Hesperidin (H)
Tanpa Penampak Noda	Sinar UV 254 nm	1	0,07 (hijau tua)	0,07 (floresen biru tua)		
		2	0,14 (hijau tua)		0,14 (hijau muda)	
		3	0,21 (hijau muda)			
		4	0,28 (hijau muda)			
		5	0,43 (hijau muda)			
		6	0,57 (hijau muda)			
		7	0,64 (hijau muda)			
		8	0,70 (biru tua)			0,70 (biru)
		9	0,71 (hijau biru)			
	Sinar UV 366 nm	1	0,07 (hijau tua)	0,07 (Hijau tua)		
		2	0,14 (hijau tua)		0,14 (floresen hijau)	
		3	0,21 (hijau muda)			
		4	0,28 (floresen hijau)			
		5	0,43 (floresen hijau)			
		6	0,57 (floresen hijau)			
		7	0,64 (floresen hijau)			
		8	0,70 (floresen biru)			0,70 (floresen biru)
		9	0,72 (floresen merah)			
	Sinar tampak	1	0,07 (kuning)	0,07 (kuning)		
		2	0,14 (kuning)		0,14 (kuning)	
		3	0,21 (kuning)			
		4	0,28 (kuning)			
		5	0,43 (kuning)			
		6	0,57 (kuning)			
		7	0,64			

		(kuning)			
	8	0,70 (kuning)			0,70 (kuning)
	9	0,71 (kuning)			

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*)

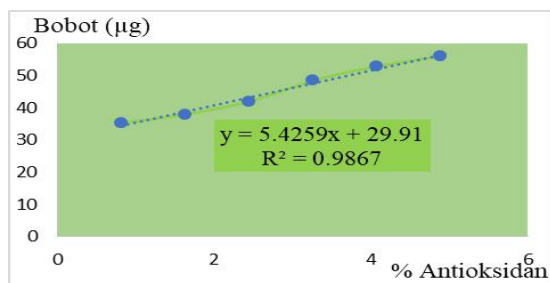
Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Dari pengujian diperoleh nilai IC₅₀ oleh ekstrak dari berbagai konsentrasi. Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) dapat dilihat pada **Tabel 4** dan **5**, serta **Gambar 4**.

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Vitamin C

Bobot (µg)	% Antioksidan	Korelasi dari Regresi Linier	Nilai IC ₅₀
0,814	35,2445	r _{hitung} = 0,9933	Bobot : 3,7026 µg C _E : 0,0370 mg/ml
1,628	37,9124	r _{tabel} (df: n=6; α = 0,05%) = 0,950	
2,442	41,9237	Y = bX + a	
3,256	48,3942	Y = 5,426 X + 29,91	
4,070	52,8031		
4,884	55,9328		

Tabel 5. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kental Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Replikasi	Nilai IC ₅₀ (mg/mL)
1	1,7578
2	2,4905
$\bar{x} \pm SD$	2,1241 ± 0,5181

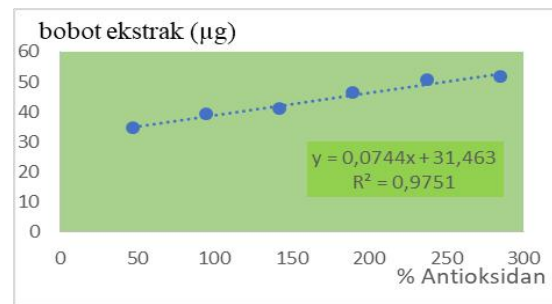


Gambar 4. Grafik yang menunjukkan hubungan antara peningkatan bobot (µg) pembanding : Vitamin C terhadap % Antioksidan

Hasil Uji Efektivitas Antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dengan Metode Difusi Sumuran Ekstrak Kental Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

a. Pemeriksaan bakteri uji *Propionibacterium acnes* secara makroskopis dan mikroskopis

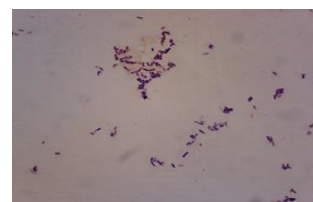
Kultur bakteri uji *Propionibacterium acnes* diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya diinokulasi pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) dan dinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan koloni bakteri uji *Propionibacterium acnes* menunjukkan hasil yang sesuai dengan pustaka yaitu berupa koloni bulat, berwarna putih, kenaikan permukaan cembung, tepi utuh, tekstur basah, halus dan translusen. Dengan pengecatan Gram menunjukan bentuk sel batang pendek, susunan sel tunggal, berpasangan, Gram positif (**Gambar 5**).



Gambar 5. Grafik yang menunjukkan hubungan antara peningkatan bobot (µg) ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap nilai % Antioksidan

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*) terhadap *Propionibacterium acnes*

Uji aktivitas dilakukan dengan metode difusi, pengujian dilakukan 3 replikasi menggunakan media BHIA yang diinokulasi dengan suspensi bakteri uji *Propionibacterium acnes* konsentrasi 1,5 x 10⁸ mo/mL. Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak konsentrasi 10%, 15%, dan 20% b/v, kontrol negatif DMSO 1%. Pencadangan yang digunakan adalah sumuran dengan diameter 6 mm. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*) terhadap *Propionibacterium acnes* dapat dilihat pada **Gambar 6** dan **Tabel 6**.



Gambar 6. Pengamatan mikroskopis *Propionibacterium acnes* dengan pewarnaan Gram, perbesaran 10 x 100

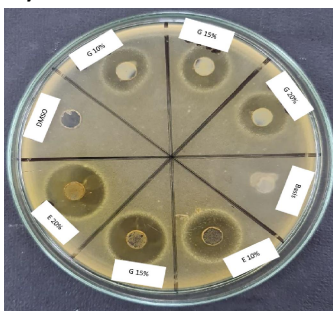
Tabel 6. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*)

terhadap *Propionibacterium acnes*

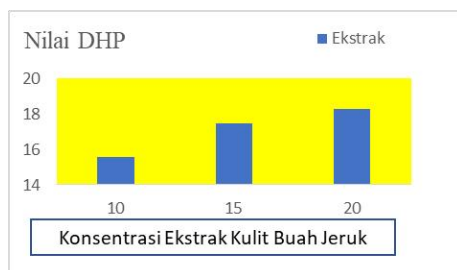
Replikasi	Daerah Hambatan Pertumbuhan (mm)			DMSO 1%	Basis
	E10%	E15%	E20%		
1	15,95	17,20	18,05	0	0
2	15,25	17,90	18,70	0	0
3	15,55	17,25	18,05	0	0
Rata-rata	15,58 ± 0,287	17,45 ± 0,319	18,27 ± 0,306	0	0

4. Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan formulasi untuk sediaan antijerawat bentuk gel dengan bahan alami berupa ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*). Dimana buah jeruk purut diperoleh dari pasar di sekitar Surabaya. Tahapan awal yang dilakukan pada buah jeruk purut yang telah didapat yaitu dilakukan sortasi terlebih dahulu yaitu dipilih buah yang memiliki ukuran diameter antara 4 – 5 cm dengan tekstur kulit buah yang hijau tua dan masih belum matang (mengkal). Selanjutnya dilakukan pencucian untuk menghilangkan kotoran dari kulitnya, selanjutnya kulit dipisahkan dari daging buahnya. Kulit buah jeruk purut tersebut selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dibawah sinar matahari pagi sebelum pukul 12.00 WIB. Kulit buah jeruk purut yang telah kering selanjutnya disebut sebagai simplisia kering. Simplisia kering yang diperoleh kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk simplisia kulit buah jeruk purut (Gambar 7 dan 8).



Gambar 7. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*) terhadap *Propionibacterium acnes*



Gambar 8. Diagram yang menunjukkan hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*) terhadap *Propionibacterium acnes*

Keterangan :

E10% : Ekstrak etanol kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*) konsentrasi 10%

E20% : Ekstrak etanol kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*) konsentrasi 15%

E30% : Ekstrak etanol kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*) konsentrasi 20%

DMSO 1% : Kontrol negatif pelarut ekstrak etanol kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*)

Basis : Kontrol negatif basis gel yang mengandung Ekstrak etanol kulit buah jeruk purut (*Citrus hystix*)

Serbuk simplisia kulit buah jeruk purut dilakukan standarisasi terlebih dahulu untuk menjamin mutu dan kualitas simplisia. Standarisasi yang dilakukan terdiri dari standarisasi non spesifik dan standarisasi spesifik. Standarisasi non spesifik meliputi susut pengeringan, penetapan kadar air, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu larut air dan kadar abu tidak larut asam. Standarisasi spesifik meliputi pengamatan organoleptis, pemeriksaan pH, penetapan kadar sari larut air dan penetapan kadar sari larut etanol.

Standarisasi non spesifik serbuk simplisia kulit buah jeruk purut (*Citrus Hystrix*.) dengan parameter berupa kadar air bertujuan untuk memberikan batasan minimal suatu batasan atau rentang mengenai besarnya kandungan air dalam suatu bahan, jika nilai kadar air relatif tinggi maka bahan akan mudah terkontaminasi oleh mikroba dan mudah terjadi reaksi enzimatik yang menyebabkan bahan aktif dapat terhidrolisa. Hasil yang didapat untuk penetapan kadar air simplisia kulit buah jeruk purut sebesar 8,89 ± 0,89%, dimana hasil tersebut memenuhi persyaratan umum kadar air yang telah ditetapkan yaitu kurang dari 10% (14). Penetapan kadar abu total dilakukan untuk mengetahui kandungan mineral pada serbuk simplisia kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) dimana diperoleh hasil uji sebesar 5,52 ± 0,23% yang menunjukkan bahwa kandungan mineral dalam serbuk simplisia kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 7% (18). Penetapan kadar abu tidak larut asam dilakukan untuk mengetahui tingkat abu simplisia yang tidak larut dalam asam dan kadar abu larut air untuk mengetahui kadar abu simplisia yang larut dalam air. Hasil penetapan kadar abu larut air adalah 5,17 ± 0,13%. Hasil penetapan kadar abu tidak larut asam adalah 0,61 ± 0,001%. Hasil standarisasi serbuk simplisia kering kulit buah jeruk purut selengkapnya dapat dilihat pada **Tabel 1.**

Standarisasi spesifik serbuk simplisia kering kulit buah jeruk purut dimulai dengan pemeriksaan organoleptis yang meliputi warna, bau dan bentuk serbuknya. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk simplisia kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) memiliki warna kuning kehijauan, berbentuk serbuk dan memiliki bau khas buah jeruk purut. Penetapan kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa dalam pelarut tertentu sesuai dengan tingkat kepolarannya. Hasil penetapan kadar sari larut air serbuk simplisia kering kulit buah jeruk purut adalah $27,82 \pm 3,77\%$ dan hasil penetapan kadar sari larut etanol sebesar $20,81 \pm 0,58\%$. Hasil standarisasi serbuk kering simplisia kulit buah jeruk purut selengkapnya dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Simplisia kering kulit buah jeruk purut yang telah distandarisasi, selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi, karena maserasi merupakan metode yang sederhana selain itu tidak membutuhkan pelarut yang lebih banyak dari perkolasi (19). Sebagai pelarut penyari digunakan etanol 96% karena bahan aktif (hesperidin atau naringenin) yang terkandung dalam serbuk simplisia kulit buah jeruk purut memiliki kelarutan dalam pelarut yang sifatnya polar dan etanol 96% memiliki sifat tersebut. Proses maserasi dilakukan dengan perbandingan sebagai berikut 1:2%b/v, dimana 1 bagian serbuk ditambahkan 5 bagian etanol selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 24 jam proses maserasi dilakukan, selanjutnya maserat ditampung dan hasil maserat yang diperoleh dilakukan proses pemekatan diatas waterbath dengan suhu dibawah 80°C hingga dihasilkan ekstrak kental berwarna kuning kehijauan (Gambar 2). Hasil ekstraksi secara keseluruhan memberikan nilai rendemen sebesar $17,59 \pm 1,70\%$ yang dihitung terhadap bobot serbuk simplisia keringnya.

Ekstrak kental kulit buah jeruk purut yang telah dipekatkan, selanjutnya dilakukan lagi standarisasi terhadap ekstrak, dimulai dengan standarisasi non spesifik yaitu penetapan kadar air. Penetapan kadar air dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui jumlah air yang terkandung dalam ekstrak kental. Hasil yang diperoleh yaitu $17,82 \pm 0,86\%$, dimana hasil tersebut memenuhi persyaratan umum yang telah ditetapkan yaitu 5 – 30% (20).

Standarisasi non spesifik yang selanjutnya yaitu penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut air dan penetapan kadar abu larut air. Penetapan kadar abu total ekstrak kental kulit buah jeruk purut

(*Citrus hystrix*) didapatkan hasil sebesar $2,17 \pm 0,22\%$ yang menunjukkan bahwa kandungan mineral dalam ekstrak kental kulit buah jeruk purut rendah. Penetapan kadar abu tidak larut asam, hasilnya diperoleh $0,04 \pm 0,0,1\%$ dan hasil penetapan kadar abu larut air yaitu $2,17 \pm 0,42\%$.

Standarisasi spesifik ekstrak kental kulit buah jeruk purut dilakukan dengan pemeriksaan organoleptis. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) memiliki warna kuning kehijauan, berbentuk kental dan memiliki bau khas buah jeruk purut.

Standarisasi spesifik ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada tahap selanjutnya yaitu penentuan nilai pH, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol. Nilai pH pada ekstrak kental kulit buah jeruk purut yaitu $5,59 \pm 0,02$ yang menunjukkan bahwa ekstrak kental tersebut bersifat asam. Penetapan kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa dalam pelarut tertentu sesuai dengan tingkat kepolarannya, kulit buah jeruk purut memiliki kelarutan yang tinggi dalam etanol dari pada pelarut air. Hasil penetapan kadar sari larut air ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) adalah $58,11 \pm 0,78\%$ dan hasil penetapan kadar sari larut etanol sebesar $65,93 \pm 0,35\%$. Hasil standarisasi ekstrak kental selengkapnya dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Penentuan profil zat aktif berkhasiat yang terkandung dalam ekstrak kental kulit buah jeruk purut yaitu hesperidin atau naringenin secara kromatografi lapis tipis diamati dengan menggunakan lampu sinar UV 254 dan VIS 366 nm yang dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 3. Hasil penentuan profil zat aktif pada ekstrak dengan fase gerak etil asetat: metanol : asam formiat (95:5:0,5 %v/v) dan fase diam silika gel 60 F254, menunjukkan bahwa didalam ekstrak terdapat senyawa aktif yaitu hesperidin, naringenin serta rutin. Noda yang terdeteksi dibawah sinar visibel 366 nm dengan harga Rf 0,70 warna florescen biru merupakan hesperidin, untuk noda berwarna florescen hijau kebiruan dengan harga Rf 0,14 merupakan naringenin dan untuk noda berwarna hijau dengan Rf 0,07 merupakan rutin. Harga Rf teoritis untuk zat aktif rutin, naringenin, dan hesperidin berturut-turut 0,167; 0,88; dan 0,07 (15). Perbedaan nilai Rf disebabkan beberapa factor antara lain proses ekstraksi serta pelarut yang digunakan saat proses analisis secara KLT tetapi secara umum dapat dikatakan bahwa dalam ekstrak yang tersari terkandung zat aktif yang memiliki khasiat sebagai antijerawat.

Berdasarkan hasil uji daya antioksidan, maka diketahui bahwa ekstrak kental kulit buah jeruk purut yang mengandung zat berkhasiat hesperidin, naringenin dan naringin memiliki daya antioksidan. Aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit jeruk purut diuji dengan menggunakan metode DPPH dikarenakan metode ini merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat, dan peka. Pengujian dilakukan secara microplate reader menggunakan larutan perbandingan, yaitu vitamin C, dan sampel dalam pelarut organik polar, yaitu metanol pada suhu kamar. Diketahui bahwa panjang gelombang maksimum dari DPPH adalah 517 nm. Parameter yang digunakan untuk mengetahui besarnya kemampuan senyawa sebagai antioksidan disebut sebagai IC₅₀, yaitu konsentrasi senyawa yang dibutuhkan untuk mengurangi radikal bebas sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ suatu senyawa, maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Dari hasil pengujian didapatkan nilai IC₅₀ dari ekstrak kental kulit jeruk purut adalah sebesar 2,49 mg/mL. Data selengkapnya dapat dilihat pada **Tabel 4 dan 5 dan Gambar 4**.

Adanya aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap *Propionibacterium acnes* dibuktikan dengan uji aktivitas antibakteri metode difusi. Hasil uji menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 10%, 15% dan 20% dengan daerah hambatan pertumbuhan (DHP) secara berurutan sebesar 15,58 ± 0,287 mm; 17,45 ± 0,319 mm; dan 18,27 ± 0,306 mm (Tabel 6 dan Gambar 6-8). Hasil data DHP tersebut selanjutnya dilakukan analisa statistik ANOVA, diketahui bahwa nilai signifikansi (sig.) atau p-value yang didapatkan adalah sebesar 0.000. Hal ini menandakan bahwa terdapat perbedaan signifikan dari 3 formula yang diuji (sig. < 0.05 berarti ada perbedaan signifikan antar grup yang diuji (21). Hasil uji dengan DMSO 1% tidak ada aktivitas, ini menunjukkan bahwa larutan DMSO 1% yang digunakan untuk melarutkan ekstrak kulit buah jeruk purut yang digunakan untuk membuat sediaan gel ekstrak kulit buah jeruk purut tidak mempengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* (22,23). Perbedaan aktivitas antimikroba yang diperoleh dengan parameter DHP tersebut disebabkan adanya perbedaan konsentrasi dari ekstrak kulit buah jeruk purut yang digunakan dimana semakin meningkat konsentrasinya maka semakin besar pula kandungan zat aktif berkhasiat yang berdifusi melalui media agar sehingga memberikan DHP lebih besar (24). Disamping itu ditunjang pula dengan semakin tinggi

konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk purut maka sediaan gel makin bersifat asam yang menyebabkan sediaan semakin encer sehingga memudahkan untuk proses difusi ke media agar yang mengandung bakteri *Propionibacterium acnes*. Aktivitas antibakteri pada ekstrak kulit jeruk purut diduga karena adanya kandungan senyawa golongan fenolik dan flavonoid yang menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme menghambat fungsi membran sel dengan cara mengganggu permeabilitas membran sel dan menghambat ikatan enzim seperti ATPase dan phospholipase (25,26).

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk purut berpengaruh terhadap efektivitas sebagai antibakteri dalam hal ini sebagai antijerawat serta sebagai antioksidan dengan penurunan nilai IC₅₀ sebesar 2,49 mg/mL.

6. Ucapan Terima Kasih

Bersama ini disampaikan ucapan terima kasih kepada para Pimpinan Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, LPPM-UKWMS dan Fakultas Farmasi yang telah memfasilitasi sehingga kegiatan penelitian ini dapat diselesaikan.

7. Daftar Pustaka

1. Prognosis Acne Vulgaris - Alomedika. [dikutip 25 Agustus 2021]. Tersedia pada: <https://www.alomedika.com/penyakit/dermatovenereologi/jerawat/komplikasi>
2. Djajadisastra J, Mun'im A, Desi NP. Formulasi Gel Topikal Dari Ekstrak Neri Folium Dalam Sediaan Antijerawat. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 2009;4(4):210-216.
3. Madelina W, Sulistyaningsih S. Review: Resistensi Antibiotik Pada Terapi Pengobatan Jerawat. *Farmaka*. 2018;16(2):105-117.
4. Miftahendrawati. Efek Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro). Universitas Hasanuddin Makassar; 2014.
5. Zaidun NH, Thent ZC, Latif AA. Combating Oxidative Stress Disorders with Citrus Flavonoid: Naringenin. *Life Sci*. 2018;208:111-122.

6. Shakour ZTA, Farek NM, Farag MA. How Do Biocatalysis and Biotransformation Affect Citrus Dietary Flavonoids Chemistry and Bioactivity? A Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2020;40(5):1-26.
7. Lim TK. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Vol 11. Switzerland: Springer International Publishing; 2012.
8. Ramli R, Zaghlul N, Nasir N. The Potential of Antioxidants and Phytochemicals Components in Fruit Waste (Peel) of *Citrus hystrix* and *Ananas comosus*. In: *Charting the Sustainable Future of ASEAN in Science and Technology*. Singapore: Springer Nature; 2020. hal. 123–36.
9. Guan M, Shi R, Zheng Y, Zeng X, Fan W, Wang Y, Su W. Characterization, in Vitro and in Vivo Evaluation of Naringenin-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion for Pulmonary Delivery. *Molecules.* 2020;25(3):554-567.
10. Wijaya YA, Widyadinata D, Irawaty W, Ayucitra A. Fractionation of Phenolic and Flavonoid Compounds from Kaffir Lime (*Citrus hystrix*) Peel Extract and Evaluation of Antioxidant Activity. *Reaktor.* 2017;17(3):111-117.
11. Liew HW, Chua BL, Chow YH. Optimisation of Ultrasonic-assisted Extraction Conditions of *Citrus hystrix* for the Total Phenolic Content. *AIP Conf. Proc.* 2020;2233(1):1-9.
12. Allaway Z. *Indoor Edible Garden*. New York: DK Publisher; 2017.
13. Kemenkes RI. *Materia Medika Indonesia*. Jilid 5. Jakarta: Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan; 1989.
14. Dirjen BPOM. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2000.
15. Dianingati RS, Novarina A, Hana AK, Muntafi'ah L. The Combination of High Calcium Milk with *Citrus maxima* Peels Ethanolic Extract Increased Bone Density of Ovariectomized Rats. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention.* 2015;6(2):42-48.
16. Molyneux P. The use of the stable free radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology.* 2004;26(2): 211-219.
17. Devi V, Sharmila S, Divyapriya S. Invitro cytotoxicity and free radical scavenging activity of aqueous extract of *Cucumis melo*. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Research.* 2011;2(6):150-156.
18. Kemenkes RI. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2009.
19. Agoes G. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: Penerbit ITB; 2009.
20. Voigt R. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi 5. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2000.
21. Bolton S, Bon C. *Pharmaceutical Statistics Practical and Clinical Applications*. Vol 135. New York: Marcel Dekker, inc.; 2004.
22. Bruggeman H. *Skin: Acne and Propionibacterium acne Genomics*. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. hal. 3216-3223
23. Bergstorm KG, Strobber BE. *Principles of topical therapy*. In: *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. Edisi 7. New York: McGraw Hill; 2008.
24. Ardina Y. *Pengembangan Formulasi Sediaan Gel Antijerawat Serta Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Daun Pepaya (*Carica Papaya* A Linn)*. Institut Teknologi Bandung; 2007.
25. Garg A, Garg S, Zaneveld LDJ, Singla AK. *Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin*. *Phytotherapy Research.* 2001;15(8):655-669.
26. Robinson T. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi 6. Diterjemahkan oleh Kosasih P. Bandung: Penerbit ITB; 1995.