

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan adalah tumbuhan bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.) yang didapatkan dari daerah Sukoharjo, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan adalah daun bidara arab yang diambil secara acak dari tanaman bidara arab yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, terbebas dari serangga.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Terdapat beberapa variabel utama pada penelitian ini, yaitu ekstrak etanol daun bidara arab, *gelling agent* carbopol 940, emulgel, formulasi emulgel ekstrak daun bidara arab, mutu fisik emulgel ekstrak etanol daun bidara arab, stabilitas emulgel ekstrak etanol daun bidara arab, aktivitas antibakteri emulgel terhadap *Propionibacterium acnes*.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi beberapa variabel diantaranya yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat diubah-ubah untuk mengetahui ataupun mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi *gelling agent* carbopol 940.

Variabel tergantung merupakan variabel yang dapat dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu fisik dan stabilitas sediaan, beserta aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes* pada sediaan emulgel.

Variabel terkendali merupakan variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung untuk itu perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah daun bidara arab, bakteri *Propionibacterium acnes*, pembuatan sediaan emulgel, peralatan yang digunakan, laboratorium, dan prosedur jalannya penelitian.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, ekstrak daun bidara arab adalah sediaan pekat yang diperoleh dari proses maserasi serbuk daun bidara arab menggunakan pelarut etanol 96% dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*.

Kedua, *gelling agent* carbopol 940 adalah bahan pembentuk gel yang divariasikan dalam formula emulgel.

Ketiga, emulgel adalah sediaan emulsi bisa dalam tipe minyak dalam air (M/A) atau tipe air dalam minyak (A/M) yang dibuat menjadi sediaan gel dengan menambahkan campuran *gelling agent*.

Keempat, formula emulgel adalah proses pembuatan emulgel yang dibuat dengan mencampurkan ekstrak dengan basis emulgel yang mengandung *gelling agent* carbopol 940 dengan variasi konsentrasi berturut-turut 1; 1,25; dan 1,5%.

Kelima, evaluasi fisik emulgel adalah proses menentukan nilai emulgel berdasarkan acuan tertentu untuk mengetahui keberhasilan pembuatan sediaan emulgel. Evaluasi fisik sediaan dilakukan menggunakan uji organoleptik, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, viskositas, dan tipe emulgel.

Keenam, stabilitas fisik sediaan emulgel adalah kemampuan emulgel dalam mempertahankan sifat dan karakteristiknya agar sama dengan saat dibuat dalam batas periode penyimpanan yang telah ditentukan. Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode *cycling test*.

Ketujuh, aktivitas antibakteri emulgel terhadap *Propionibacterium acnes* adalah kemampuan emulgel untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* yang dilakukan dengan metode difusi sumuran menggunakan *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebagai media pengujian dan diameter daya hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Penelitian ini membutuhkan peralatan seperti sarung tangan, masker, pisau, mortir dan stamper, blender, neraca analitik, gelas ukur, glass beaker, erlenmeyer, batang pengaduk, ayakan no. 60 *mesh*, *aluminium foil*, bejana maserasi, *rotary evaporator*, *waterbath*, kertas saring *whatman* no.42, tabung reaksi, corong, bunsen, label, jarum ose, pinset, mikropipet, cawan petri, inkubator, autoklaf, *Laminar Air Flow*

(LAF), mikroskop, *hot plate*, *magnetik stirer*, *incubator shaker*, *boorprof*, kapas lidi, jangka sorong, pH meter, *glass object*, viskometer *Brookfield*, dan *cycling test*.

## 2. Bahan

**2.1 Bahan sampel.** Bahan sampel dalam penelitian ini adalah daun bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.) dari daerah Sukoharjo, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah.

**2.2 Bakteri uji.** Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Propionibacterium acnes* yang didapatkan dari Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

**2.3 Bahan yang dibutuhkan.** Bahan lain yang dibutuhkan adalah etanol 96%, HCL 2N, aquades, pereaksi *Bouchardat* LP, pereaksi *Dragendorff*, Asetat anhidrida, serbuk Mg, HCl pekat, amil alkohol, larutan FeCl<sub>3</sub>, etanol 70%, larutan NaCl 0,9%, larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, larutan standar *Mc Farland* 0,5, larutan BaCl<sub>2</sub> 1% , larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *methylene blue*, reagen Kovac , larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, kristal violet, *lugol's iodine*, carbopol 940, tween 80, span 80, propilen glikol, metil paraben, propil paraben, trietanolamin (TEA), parafin cair, dan klindamisin.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel dari tanaman bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.) dengan mencocokkan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis dengan menggunakan pedoman buku sebagai acuan yang dibuktikan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

### 2. Preparasi sampel

Pengambilan daun bidara arab diambil dari daerah Sukoharjo, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah dengan memilih daun bidara arab yang berwarna hijau, terbebas dari serangga, dan segar. Daun bidara arab yang sudah terkumpul digunakan untuk tahap selanjutnya agar dihasilkan serbuk halus.

### 3. Pembuatan serbuk

Sampel daun bidara arab yang masih segar dilakukan sortasi basah, dicuci, ditiriskan lalu dikeringkan dalam suhu kamar dan tidak terkena sinar matahari langsung. Sampel yang telah selesai dikeringkan dilakukan pemilahan bahan (sortasi kering) dan dilakukan proses penghalusan dengan alat *disk mill*, kemudian diayak menggunakan

ayakan nomor 40 *mesh* hingga diperoleh serbuk yang halus.

**3.1 Penetapan susut pengeringan.** Penetapan ini dilakukan dengan menggunakan *mouisture balance* dilakukan dengan cara memasukkan lebih kurang 2 g serbuk ke dalam alat yang sudah diatur suhunya 105<sup>0</sup>C dan ratakan, kemudian ditunggu hingga alat berbunyi dan catat nilai yang tertera di *display*. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali dengan langkah yang sama dan dilakukan perhitungan hingga diperoleh rata-rata (Sediarso *et al.*, 2019).

**3.2 Penetapan kadar air.** Penentuan kadar air dilakukan dengan metode destilasi yaitu ditimbang serbuk yang diperkirakan mengandung 2 mL sampai 4 mL air lalu masukkan ke dalam labu, timbang sehelai logam yang ukurannya sesuai dengan leher labu, masukkan sekitar 200 mL toluen ke dalam labu kemudian rangkai alat. Toluena dimasukkan ke dalam tabung penerima melalui alat pendingin. Labu dipanaskan selama 15 menit, ketika sudah pemanas mulai penyulingan dengan kecepatan 2 tetes/detik jika sudah sebagian air tersuling lalu naikan penyulingan menjadi 4 tetes/detik. Apabila semua air telah tersuling, tabung dicuci dengan toluen kemudian dilakukan penyulingan selama 5 menit. Tabung penerima dingin dibiarkan hingga mencapai suhu kamar, jika air dan toluen sudah memisah sempurna, baca volume air dan hitung volume kadar air dalam persen. Hasil kadar air yang baik yaitu tidak lebih dari 10% karena jika kadar air melebihi 10% maka dapat menyebabkan penurunan kualitas ekstrak, ekstrak akan mudah ditumbuhi mikroorganisme dan dapat merubah cara kerja enzim ataupun zat aktif (Depkes RI, 2000).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{volume air (ml)}}{\text{berat serbuk (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 4. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi yaitu ditimbang 1 kg gram serbuk daun bidara arab yang sudah halus kemudian dilarutkan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 10 liter (10 bagian). Hasil pencampuran, selanjutnya direndam selama 1 kali 24 jam dengan sesekali diaduk. Maserat yang didapatkan disaring menggunakan kertas saring dengan tujuan untuk memisahkan filtrat dan residu. Tahap penyarian diulang sebanyak 2 kali dengan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali dari penyarian pertama. Seluruh filtrat hasil penyarian dilakukan penguapan menggunakan *rotary evaporator* pada temperatur 40<sup>0</sup>C sampai didapatkan ekstrak kental,

kemudian dilakukan perhitungan rendemennya (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat simplisia awal (g)}} \times 100\% \quad (2)$$

**4.1 Susut pengeringan.** Ditimbang 1 gram ekstrak daun bidara arab, lalu dimasukkan ke dalam krus yang sudah dipanaskan selama 30 menit pada suhu 105°C. Ekstrak disamaratakan dengan menggoyangkan krus hingga terbentuk lapisan 5-10 mm, kemudian dikeringkan dengan suhu 105°C sampai didapatkan bobot konstan (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Susut pengeringan (\%)} = \frac{(b-a)-(c-a)}{(b-a)} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan :

- a : berat bobot timbang dangkal kosong (g)
- b : berat bobot timbang dangkal + ekstrak (g)
- c : berat bobot timbang dangkal + ekstrak yang telah dikeringkan (g)

**4.2 Organoleptik ekstrak.** Pengamatan organoleptik ekstrak bertujuan memberikan pengenalan awal terhadap ekstrak. Pengamatan organoleptik dilakukan menggunakan panca indera dengan mendeskripsikan bentuk, warna, bau dan rasa (Depkes RI., 2000).

## 5. Identifikasi kandungan kimia

**5.1 Uji alkaloid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun bidara arab ditimbang, kemudian dimasukkan 1 mL HCl 2N dengan 9 mL aquades, dipanaskan di *waterbath* selama kurang lebih 5 menit, lalu dilakukan pendinginan serta penyaringan hingga diperoleh filtrat. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 2 bagian. Filtrat pertama diberi 2-3 tetes larutan *Dragendorff*. Warna jingga atau merah pada larutan menandakan hasil positif alkaloid. Filtrat kedua diberi larutan *Bouchardat* LP sebanyak 2 tetes, hasil menunjukkan positif alkaloid apabila terjadi endapan berwarna coklat hitam (Depkes, 1995).

**5.2 Uji flavonoid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun bidara arab ditimbang, air panas ditambahkan secukupnya lalu disaring hingga didapatkan filtrat. Sebanyak 5 mL filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan dimasukkan 2-3 tetes HCl pekat kemudian dikocok. Sebanyak 2 mL amil alkohol ditambahkan ke dalam tabung, kemudian dikocok dengan kuat dan biarkan hingga memisah. Munculnya warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol menandakan hasil positif flavonoid (Depkes, 1995).

**5.3 Uji tanin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun bidara arab ditimbang, lalu dilarutkan dengan air panas kemudian dimasukkan 2-3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Munculnya warna biru tua kehitaman atau hijau kehitaman menandakan hasil positif adanya tanin (Depkes, 1995).

**5.4 Uji saponin.** Sebanyak 0,5 gram Ekstrak daun bidara arab ditimbang, lalu ditambahkan air hangat dan dimasukkan ke tabung reaksi, digojok hingga membentuk busa. Hasil positif saponin ditandai dengan munculnya busa tinggi yang stabil selama kurang lebih 10 menit pada ketinggian busa yaitu 1-10 cm, dan ketika ditambahkan asam klorida 2N busa tidak menghilang (Depkes, 1995).

**5.5 Uji steroid/triterpenoid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun bidara arab ditimbang dan diencerkan dengan air panas, kemudian diuapkan menggunakan cawan penguap. Residu yang telah diperoleh diberi 0,5mL kloroform lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan asetat anhidrida kemudian secara perlahan diberi  $H_2SO_4$  pekat melalui dinding tabung. Hasil positif mengandung steroid jika adanya cincin biru kehijauan dan dikatakan positif triterpenoid jika adanya cincin coklat atau violet (La *et al.*, 2020).

## 6. Rancangan formula emulgel

Berdasarkan penelitian Hanifa *et al.* (2019) formulasi yang dapat digunakan untuk membuat sediaan emulgel ekstrak etanol daun bidara arab dengan variasi konsentrasi *gelling agent* carbopol 940 berturut-turut 1; 1,25; dan 1,5% sebagai berikut :

**Tabel 1. Formulasi emulgel ekstrak etanol daun bidara arab**

Bahan	Konsentrasi (%)					
	Basis			Formula		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Ekstrak etanol daun bidara arab	-	-	-	10	10	10
Carbopol 940	1	1,25	1,5	1	1,25	1,5
TEA	1	1	1	1	1	1
Tween 80	6	6	6	6	6	6
Span 80	4	4	4	4	4	4
Setostearil alkohol	1	1	1	1	1	1
Parafin cair	4	4	4	4	4	4
Propilen glikol	4	4	4	4	4	4
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	0,2	0,02
Aquades ad	100	100	100	100	100	100

Keterangan :

Kontrol (-) F1 : Basis emulgel ekstrak mengandung konsentrasi carbopol 940 0,5%

Kontrol (-) F2 : Basis emulgel ekstrak mengandung konsentrasi carbopol 940 1%

Kontrol (-) F3 : Basis emulgel ekstrak mengandung konsentrasi carbopol 940 1,5%

F1 : Emulgel ekstrak daun bidara arab mengandung konsentrasi carbopol 940 1%

F2 : Emulgel ekstrak daun bidara arab mengandung konsentrasi carbopol 940 1,25%

F3 : Emulgel ekstrak daun bidara arab mengandung konsentrasi carbopol 940 1,5%

Penelitian ini menggunakan 6 formula emulgel anti jerawat ekstrak etanol daun bidara arab dengan variasi konsentrasi carbopol 940 berturut-turut sebesar 1; 1,25; dan 1,5%, serta 3 kontrol negatif yaitu basis emulgel tanpa bahan aktif ekstrak etanol daun bidara arab.

## **7. Pembuatan sediaan emulgel**

Proses pembuatan emulgel ekstrak etanol daun bidara arab diawali dengan menyiapkan alat dan bahan yang sudah ditimbang sesuai dengan masing-masing formula yang sudah ditentukan. Pembuatan basis gel dilakukan dengan cara menaburkan serbuk carbopol 940 ke dalam mortir yang berisi aquades (jumlah air yang diambil sebagian dari proporsi pelarut air dalam keseluruhan formula), carbopol 940 dibiarkan mengembang, selanjutnya diaduk hingga carbopol 940 terdispersi homogen, kemudian sebanyak 1 mL TEA diteteskan sedikit demi sedikit untuk menetralkan pH carbopol 940, lalu aduk hingga homogen dan terbentuk basis gel yang kental dan jernih. Langkah berikutnya yaitu membuat basis emulsi dengan mencampurkan fase minyak dan fase air. Pembuatan fase minyak dilakukan dengan cara span 80 dan parafin cair dicampurkan pada *beaker glass*, diaduk di atas *waterbath* pada suhu 60- 70 °C sampai homogen. Sedangkan pembuatan fase air dilakukan dengan cara Tween 80, metil paraben, propil paraben dilarutkan ke dalam propilen glikol pada *beaker glass*, dicampur dan diaduk di atas *water bath* pada suhu 60-70°C sampai homogen. Fase minyak dicampurkan ke dalam fase air sedikit demi sedikit dalam *beaker glass*, diaduk secara konstan menggunakan batang pengaduk sampai terbentuk emulsi yang berwarna putih susu. Pengadukan dilanjutkan sampai temperatur emulsi perlahan turun dan mencapai suhu kamar. Ekstrak etanol daun bidara arab yang sudah dilarutkan dengan sebagian air ditambahkan ke dalam basis emulsi lalu diaduk sampai terbentuk massa emulsi yang homogen. Tahap terakhir, basis gel dan basis emulsi dicampur dan diaduk secara konstan sampai tercampur sempurna, lalu ditambahkan sisa air sampai mencapai bobot emulgel yang diinginkan.

## **8. Pengujian mutu fisik dan stabilitas sediaan emulgel**

**8.1 Uji organoleptik.** Pengujian ini dimaksudkan untuk melihat penampilan fisik secara visual. Evaluasi organoleptik terdiri dari perubahan warna, bau/ketengikan, konsistensi, dan pemisahan fase. Spesifikasi emulgel yang harus terpenuhi yaitu warna sediaan yang homogen, aroma yang khas, konsistensi lembut, dan tidak ada pemisahan fase (Diah dan Renny, 2018).

**8.2 Uji homogenitas.** Pengujian homogenitas emulgel ekstrak etanol bidara arab dilakukan dengan mengambil sediaan dari atas, tengah, dan bawah. Sediaan dioleskan pada *object glass* yang bersih dan kering hingga membentuk lapisan yang tipis, kemudian ditutup dengan *object glass* yang lain dan diamati di bawah mikroskop. Emulgel yang homogen ditandai dengan tidak adanya gumpalan atau partikel kasar pada setiap bagiannya (Diah dan Renny, 2018; Naibaho *et al.*, 2013).

**8.3 Uji pH.** Uji ini dilakukan dengan pH meter dan bertujuan untuk mengetahui pH dari sediaan. Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan cara mencelupkan elektroda ke dalam emulgel, jarum dibiarkan bergerak hingga kondisi stabil, dan nilai pH akan ditampilkan. Emulgel sebaiknya memiliki pH kisaran 4,5-6,5 agar kulit tidak teriritasi (Yenti *et al.*, 2014).

**8.4 Uji daya lekat.** Pengujian ini dilakukan dengan menempatkan 1 g emulgel diatas *object glass* yang luasnya sudah ditentukan, lalu *object glass* lain diletakkan di atas emulgel kemudian ditekan menggunakan beban 1 kg selama lima menit. Setelah lima menit, beban dilepas, kemudian *object glass* diberi beban pelepasan 80 g untuk pengujian. Waktu lekat sediaan krim dihitung saat kedua *object glass* saling lepas (Rahmawati *et al.*, 2010). Hasil daya lekat yang baik adalah lebih dari empat detik (Wasiatmadja, 1997).

**8.5 Uji daya sebar.** Pengujian ini dilakukan dengan menempatkan sampel 0,5 g di atas permukaan kaca bulat pada diameter 15 cm dan kaca yang lainnya ditempatkan di atasnya, kemudian ditunggu selama kurang lebih 1 menit, kemudian diameter yang tersebar di beberapa sisi diukur. Satu menit setelahnya diberi tambahan beban 50 gram, lalu dibiarkan selama 1 menit, dan diukur daya sebar nya kemudian setiap 1 menit selanjutnya juga dilakukan penambahan berat 50 gram hingga berat total 150 gram. Sediaan akan nyaman ketika diaplikasikan jika memiliki rentang daya sebar sebesar 5-7 cm diaplikasikan (Garg *et al.*, 2002).

**8.6 Uji viskositas.** Pengujian ini dilakukan menggunakan alat viskometer *Brookfield* (Rion VT 04F). Sampel dituang ke dalam gelas ukur 50 mL, kemudian dipasang *spindle* nomor 2. *Spindle* diturunkan secara tegak lurus ke tengah sediaan dengan hati-hati agar *spindle* tidak menyentuh dasar beaker glass dan diputar dengan kecepatan 50 rpm. Viskometer dijalankan, kemudian nilai viskositas dari sediaan akan

terbaca (Wijayanti dan Faizatun, 2011). Nilai viskositas emulgel yang baik kisaran 150-350 dPa.s (Falahi *et al.*, 2021).

**8.7 Uji tipe emulsi.** Pengujian ini dimaksudkan untuk menentukan tipe dari emulgel yang telah dibuat, apakah emulgel termasuk M/A atau A/M. Tipe M/A merupakan emulsi tersusun dari butiran minyak yang tersebar terdispersi ke dalam air, minyak sebagai fase dalam dan air sebagai fase luar. Tipe A/M merupakan emulsi tersusun dari butiran air yang tersebar atau terdispersi ke dalam minyak, air sebagai fase dalam dan minyak sebagai fase luar. Pengujian tipe emulsi bisa dilakukan dengan metode pengenceran, dispersi larutan zat warna, dan konduktivitas.

**8.7.1 Metode pengenceran.** Pada metode ini dilakukan dengan cara mengambil sediaan emulgel secukupnya dan masukkan ke dalam *beaker glass* kemudian encerkan dengan air. Jika emulgel dapat diencerkan maka tipe emulsinya adalah M/A dan jika tidak dapat diencerkan maka tipe emulsinya adalah AM (Sanjay, 2003).

**8.7.2 Metode dispersi larutan zat warna.** Pada metode ini dilakukan dengan cara mengambil sediaan emulgel secukupnya dan masukkan ke dalam *beaker glass* kemudian beri beberapa tetes *methylene blue*. Jika warna biru cepat terdispersi keseluruh emulgel maka tipe emulsinya adalah M/A namun jika warna biru tidak terdispersi seluruhnya maka tipe emulsinya adalah A/M (Sanjay, 2003).

**8.7.3 Metode konduktivitas.** Pada metode ini dilakukan dengan cara mengambil sediaan emulgel sebanyak 25 mL dan masukkan ke dalam *beaker glass* selanjutnya alat konduktometer dimasukkan dan ditunggu beberapa saat. Jika jarum pada konduktometer bergerak maka tipe emulsinya adalah M/A, apabila jarum pada konduktometer tidak bergerak maka tipe emulsinya adalah A/M. Metode ini menggunakan prinsip sifat air yang dapat menghantarkan listrik, sehingga jika fase eksternal dari emulsi adalah air (tipe M/A) maka emulsi dapat menghantarkan listrik, dan jika fase eksternal dari emulsi adalah minyak (tipe A/M) maka emulsi tidak dapat menghantarkan listrik (Wahyuddin *et al.*, 2020).

## 9. Uji stabilitas

Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan *cycling test* yaitu dengan cara sediaan disimpan pada periode waktu tertentu dengan suhu diatas normal (Ika *et al.*, 2014). Emulgel disimpan dalam kulkas lebih kurang 24 jam pada temperatur kurang lebih 4°C, kemudian

dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam oven lebih kurang 24 jam pada temperatur kurang lebih 40<sup>0</sup>C. Proses ini terhitung 1 siklus dan dilakukan sebanyak 6 siklus kemudian dilakukan perbandingan kondisi sediaan emulgel sebelum dan sesudah pengujian meliputi organoleptik, homogenitas, pH, dan viskositas (Magdalena *et al.*, 2016). Hasil data stabilitas sediaan dengan *cycling test* dianalisis statistik dengan menggunakan *Paired-Samples T Test*.

## **10. Identifikasi *Propionibacterium acnes***

### **10.1 Identifikasi morfologi secara pewarnaan gram.**

Pewarnaan gram positif *Propionibacterium acnes* menggunakan kristal violet yang direkatkan selama 60 menit, dan dibilas dengan aquades, lalu ditambah dengan *lugol's iodine*. Warna yang telah terbentuk dihilangkan menggunakan alkohol dan dibilas dengan air suling, kemudian diwarnai kembali menggunakan fuksin selama 1-2 menit, lalu dibilas dengan air, dikeringkan, dan diamati dengan mikroskop pada lensa objek perbesaran 100x. Hasil menunjukkan bakteri *Propionibacterium acnes* jika pada pemeriksaan mikroskopik diperoleh isolat berbentuk basil dan bakteri tetap mempertahankan zat pewarna dari kristal violet (Prapanta, 2014).

**10.2 Identifikasi biokimia secara fisiologi.** Identifikasi pada biokimia secara fisiologi ada 2 cara yaitu katalase dan indol. Pada uji katalase *Propionibacterium acnes* dapat membentuk enzim katalase yang ditandai dengan timbulnya gelembung- gelembung udara. Pengujian katalase dilakukan dengan cara koloni bakteri diberi tetesan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada *objek glass*. Pada uji indol *Propionibacterium acnes* menggunakan enzim *tryptophanase* yang dapat menghidrolisis tryptophan menjadi indol, piruvat dan amonia. Pengujian indol dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat pada media pepton kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Setelah itu, teteskan perlahan reagen Kovac pada dinding tabung hingga terlihat garis pemisah antara media dan reagen Hasil positif mengandung indol dinyatakan dengan adanya cincin merah (Lestari *et al.*, 2015).

## **11. Pembuatan media dan kultur bakteri *Propionibacterium acnes***

Pembuatan kultur bakteri dilakukan dengan menimbang NA (*Nutrient Agar*) sebanyak 0,4 gram, agar sebanyak 1 gram, dan glukosa sebanyak 0,5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan dilarutkan dengan 50 mL aquades. Tahap selanjutnya, *beaker glass* yang telah terisi tadi dipanaskan sambil diaduk secara perlahan hingga

mendidih. Masing-masing tabung reaksi yang telah disterilkan dan dimasukan sebanyak 15 mL serta ditutup dengan kapas. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, lalu dibiarkan pada suhu ruangan selama 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30°C. Bakteri *Propionibacterium acnes* diambil dengan ujung ose, selanjutnya ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores secara zig-zag, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada dengan suhu 37°C selama 24 jam (Soemarie *et al.*, 2018).

## **12. Pembuatan suspensi bakteri**

Pembuatan suspensi bakteri untuk difusi dengan cara mengambil biakan murni kurang lebih 2 ose bakteri *Propionibacterium acnes* lalu disuspensikan ke dalam 5 mL NaCl 0,9%, dan diaduk menggunakan vortex hingga homogen. Suspensi bakteri *Propionibacterium acne* distandarkan dengan larutan *Mc Farland*. Tujuan standar menggunakan *Mc Farland* 0,5 agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan dapat mengurangi kepadatan bakteri pada saat pengujian (Sogandi *et al.*, 2020).

## **13. Pembuatan variasi konsentrasi larutan uji ekstrak daun bidara arab**

Variasi konsentrasi larutan uji ekstrak etanol daun bidara arab terdiri dari konsentrasi 7; 10; 13; dan 16%. Masing-masing ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan DMSO 5%, kemudian diaduk hingga larut. Larutan DMSO 5% dibuat dengan cara diambil 1 mL larutan DMSO pekat 100% lalu ditambahkan 20 mL aquades, dan diaduk hingga homogen (sebagai kontrol negatif DMSO 5%). Hasil perhitungan pembuatan variasi konsentrasi larutan uji ekstrak etanol daun bidara arab dapat dilihat pada lampiran 9.

## **14. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun bidara arab**

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun bidara arab dilakukan untuk mengetahui apakah sediaan ini mampu membunuh bakteri *Propionibacterium acnes*. Pada pengujian aktivitas antibakteri ini dilakukan menggunakan metode difusi sumuran yaitu media MHA dituang sebanyak ± 60 mL ke dalam cawan petri, dan dibiarkan hingga memadat. Kapas lidi steril dicelupkan pada suspensi bakteri *P. acnes* kemudian diinokulasi secara merata dalam media MHA dan ditunggu selama 15 menit sampai mengering. Tahap selanjutnya, dibuat 5

sumuran pada cawan petri dengan menggunakan *boorprof* dengan ukuran diameter 8 mm. Ekstrak etanol daun bidara arab konsentrasi 7; 10; 13; dan 16% beserta kontrol negatif (DMSO 5%) diambil sebanyak 50  $\mu$ l dengan menggunakan mikropipet. Percobaan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan penggaris.

### **15. Pengujian aktivitas antibakteri emulgel**

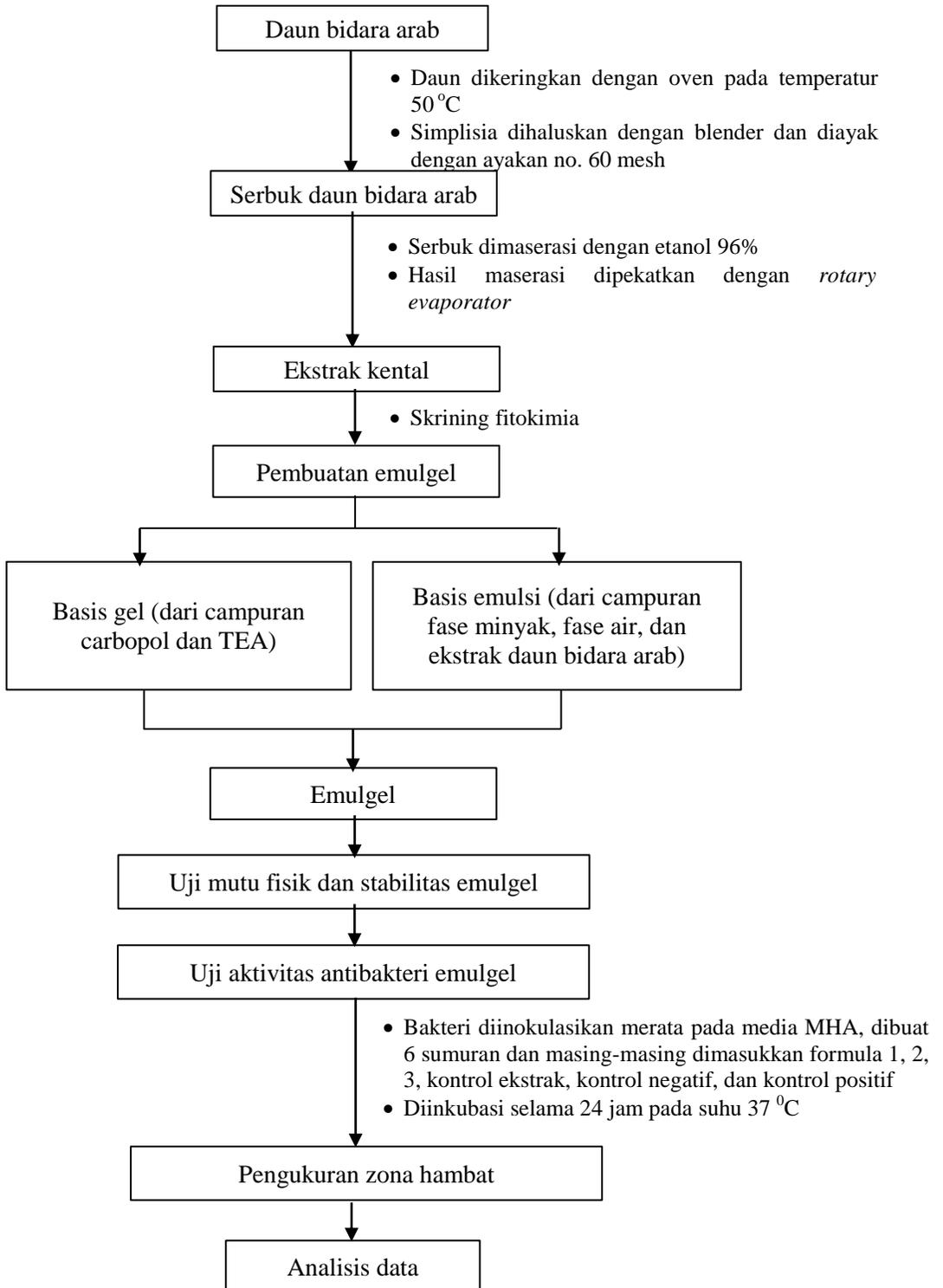
Uji aktivitas antibakteri sediaan emulgel ekstrak etanol daun bidara arab dilakukan untuk mengetahui apakah sediaan ini mampu membunuh bakteri *Propionibacterium acnes*. Pada pengujian aktivitas antibakteri ini dilakukan menggunakan metode difusi sumuran yaitu media MHA dituang sebanyak  $\pm$  60 mL ke dalam cawan petri, dan dibiarkan hingga memadat. Kapas lidi steril dicelupkan pada suspensi bakteri *P. acnes* kemudian diinokulasi secara merata dalam media MHA dan ditunggu selama 15 menit sampai mengering. Tahap selanjutnya, dibuat 6 sumuran pada cawan petri dengan menggunakan *boorprof* dengan ukuran diameter 8 mm. Formula 1, 2, 3, kontrol ekstrak, kontrol negatif, dan kontrol positif ditimbang masing-masing sebanyak 50 mg dan dimasukkan ke dalam sumur-sumur yang sudah tersedia dengan menggunakan spatel. Percobaan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan penggaris.

### **L. Analisis data**

Emulgel dari setiap formula diuji mutu sifat fisik meliputi organoleptis, pH, homogenitas, viskositas, daya sebar, daya lekat, stabilitas emulgel dan aktivitas antibakteri. Data pada hasil penelitian yang diperoleh dilakukan analisis dengan metode statistik menggunakan aplikasi SPSS. Data stabilitas emulgel dilakukan dengan *Paired Sample T Test*. Tujuan dari uji ini adalah untuk melihat apakah terdapat perbedaan pada kelompok variabel selama periode penyimpanan. Apabila hasil tidak terdistribusi normal maka dilakukan analisis lanjutan dengan non parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Wilcoxon* untuk melihat perbedaan antar kelompok variabel. Data hasil evaluasi fisik sediaan meliputi : nilai pH, daya sebar, daya lekat, viskositas, tipe emulgel, dan aktivitas

antibakteri dianalisis normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Data dikatakan normal apabila nilai  $p > 0,05$ , namun dapat dikatakan tidak normal apabila nilai  $p < 0,05$ , yang kemudian dilanjutkan uji homogenitas varian menggunakan uji *Levene Test*. Hasil jika homogen maka dilanjutkan uji *One-way ANOVA* yang memiliki taraf kepercayaan 95%. Hasil yang didapatkan jika tidak normal dan tidak homogen, maka perlu dilakukan analisis uji nonparametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis* yang selanjutnya diuji *Mann-Whitney*.

### M. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur penelitian