

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

#### **1. Populasi**

Populasi adalah keseluruhan dari subjek penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh.

#### **2. Sampel**

Sampel adalah sebagian dari populasi yang akan diteliti. Sampel dalam penelitian ini yaitu sediaan emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh dengan variasi HPMC 1%, 3% dan 5%.

### **B. Variabel Penelitian**

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

Variabel utama yang pertama pada penelitian ini adalah emulgel.

Variabel utama yang kedua pada penelitian ini adalah emulgel ekstrak buah belimbing wuluh dengan konsentrasi HPMC 1%, 3% dan 5%.

Variabel utama yang ketiga pada penelitian ini adalah stabilitas dan mutu fisik sediaan emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh.

Variabel utama yang keempat pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap bakteri *S. aureus*.

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

Variabel utama dapat diklasifikasikan menjadi 3 macam yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dapat diubah dan diatur untuk mengetahui pengaruh pada variabel tergantung.

Variabel kendali adalah variabel yang dapat mengganggu variabel tergantung sehingga harus ditentukan terlebih dahulu kualifikasinya supaya hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat.

Variabel tergantung merupakan variabel hasil akibat dari variabel bebas.

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi HPMC 1%, 3% dan 5%. Variabel kendali pada penelitian ini yaitu ekstrak buah

belimbing wuluh, bakteri uji *S. aureus*, pembuatan suspensi, suhu, sterilisasi, derajat pengolesan, metode penelitian, kondisi laboratorium, kondisi peneliti, metode difusi, jumlah bakteri suspensi, dan media.

Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu uji mutu fisik dan stabilitas emulgel serta aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah belimbing wuluh pada bakteri *S. aureus*.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, buah belimbing wuluh adalah buah belimbing wuluh yang didapat dari B2P2TOOT Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah. Karakteristik populasi dan sampel buah belimbing wuluh yang segar berwarna hijau kekuningan.

Kedua, ekstrak etanol buah belimbing wuluh adalah ekstrak yang dimaserasi dengan etanol 96% selama 48 jam.

Ketiga, sediaan emulgel adalah pembuatan sediaan gel dengan basis *gelling agent* HPMC.

Keempat, uji mutu fisik sediaan emulgel dengan variasi HPMC 1%, 3%, dan 5% adalah uji yang meliputi uji organoleptik, uji pH, uji viskositas, uji daya busa, dan uji homogenitas.

Kelima, Uji stabilitas sediaan emulgel adalah pengujian sediaan menggunakan metode *cycling test*.

Keenam, bakteri uji dalam penelitian ini adalah bakteri *S. aureus* yang diperoleh dari Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, aktivitas antibakteri dari sediaan emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh adalah pengujian aktivitas yang menggunakan metode difusi cakram *disk* untuk mengetahui aktivitas antibakteri sediaan yang dilihat berdasarkan ukuran zona bening yang terbentuk. Zona bening yang terbentuk dari pengujian antibakteri adalah hasil kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat yang digunakan yaitu erlenmeyer, neraca analitik, gelas ukur, pisau, pipet tetes, toples kaca, botol coklat maserasi, saringan, toples, *beaker glass*, *vacum rotary evaporator*, desikator, oven, *waterbath*, lampu spirtus, ayakan *mesh* no 60, mortir dan stamper, sudip, neraca analitik, tabung reaksi, *beaker glass*, batang pengaduk, gelas ukur, Erlenmeyer, cawan porselin, pipet tetes, kaca arloji,

*moisture balance*, viskometer *Brookfield*, pH meter, *Laminar Air Flow* (LAF), *vortex mixer*, jangka sorong, korek api, rak tabung reaksi, cawan petri, lampu spiritus, jarum ose, pH meter, pinset, kapas, label, inkubator, *autoclave*, oven, mikropipet, cakram *disk*, *object glass*, mikroskop, *ent-kas*, kertas coklat, pipet pasteur steril, mikroskop, jarum ose, pipet volume, *deckglass*, bunsen.

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu buah belimbing wuluh, etanol 96%, HPMC, ekstrak etanol buah belimbing wuluh, parfin cair, span 80, tween 80, propilenglikol, propil paraben, metil paraben, dan aquadest, bakteri *S. aureus*, sediaan emulgel pembanding, klindamisin solution 1,2 %, media *Nutrient Agar* (NA), media *Manitol Salt Agar* (MSA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media BHI, *crystal violet*, *safranin*, cairan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koagulase plasma, larutan *Mc. Farland*, larutan lugol, reagen Dragendroff, reagen Wagner, Etanol 96%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, HCl pekat, logam Mg, air hangat, FeCl<sub>3</sub>, pewarna kristal violet, pewarna lugols iodine, etanol 96% atau aseton, dan safranin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, BHI, plasma kelinci.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Determinasi dalam penelitian ini berfungsi untuk mengetahui kesesuaian sampel buah belimbing wuluh. Determinasi berlangsung dengan pencocokan secara morfologis. Ciri-ciri belimbing wuluh sesuai dengan literatur yang dilakukan oleh UPT Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

### 2. Pengambilan bahan

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah diambil dari bagian buah belimbing wuluh yang segar dan sehat secara acak, dibersihkan di bawah air mengalir (Wijayanti dan Safitri, 2018). Serbuk simplisia diperoleh dengan cara diblender hingga menjadi serbuk halus dan diayak dengan ayakan no 60. Serbuk ditimbang menggunakan neraca analitik berdasarkan bahan yang dibutuhkan dalam membuat ekstrak.

### 3. Pemeriksaan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan menggunakan alat yaitu *moisture balance*. Langkah awal, serbuk ditimbang sebanyak 2 g, lalu dimasukkan kedalam *moisture balance*. Nilai yang konstan ada susut

pengeringan serbuk ditandai dengan bunyi alarm pada alat. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi dengan syarat kelembapan  $\leq$  10% (Depkes RI, 2000).

#### **4. Pembuatan ekstrak etanol buah belimbing wuluh**

Ditimbang 1000 gram serbuk simplisia dari buah belimbing wuluh yang sudah dihaluskan, masukkan ke dalam wadah tambahkan pelarut etanol 96% hingga 10 liter, dibiarkan serbuk simplisia terendam sepenuhnya. Dilakukan pengadukan terlebih dahulu sebelum waktu dihitung. Waktu maserasi dihitung setelah pengadukan, yaitu dimaserasi selama 48 jam. Hasil maserasi disaring dengan kain flanel sampai diperoleh ekstrak cair yang tanpa ampas daun belimbing wuluh dan dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring. Ampas direndam kembali dengan setengah pelarut awal atau 5 liter etanol 96%. Ekstrak cair dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak ditimbang dan dihitung rendemennya dengan menimbang hasil ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Avverhoa bilimbi L.*) dibagi berat serbuk awal yang diekstraksi (*Avverhoa bilimbi L.*) dikalikan 100% (Yulianingtyas dan Kumartono, 2016).

#### **5. Pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol buah belimbing wuluh**

Pemeriksaan organoleptis ekstrak buah belimbing wuluh dilakukan dengan cara: melihat sifat fisik ekstrak. Pemeriksaan organoleptik meliputi: Melihat bentuk, warna dan aroma/bau ekstrak buah belimbing wuluh yang diperoleh.

#### **6. Penetapan kadar air ekstrak**

Penetapan kadar air ekstrak dilakukan dengan metode destilasi. Toluene 100 ml dituangkan menggunakan aquadest 10 ml kemudian menimbang ekstrak 20 gr dimasukkan dalam labu alas bulat. Toluene dituangkan dalam labu alas bulat kemudian labu tersebut dipanaskan 15 menit hingga semua air tersuling. Volume air dibaca sesaat setelah toluene dan air memisah sempurna. Dikatakan memenuhi syarat jika kadar air dalam ekstrak tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 2020).

#### **7. Skrining fitokimia kandungan senyawa ekstrak etanol buah belimbing wuluh**

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol buah belimbing wuluh.

Pengujian fitokimia meliputi uji tanin, saponin dan flavonoid (Aryantini *et al.*, 2020).

**7.1. Tanin.** Ekstrak simplisia buah belimbing wuluh sebanyak 3 gram ditambah 10 ml akuades, dipanaskan selama 5 menit. Kemudian disaring, filtratnya ditambahkan 3 tetes FeCl 10 %. Uji positif tanin ditandai dengan terbentuknya warna hitam (Masaenah, 2019).

**7.2. Saponin.** Ekstrak simplisia buah belimbing wuluh sebanyak 3 gram ditambahkan 10 ml air dan dipanaskan selama 5 menit selanjutnya disaring dan filtratnya diambil sebanyak 5 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian larutan dikocok selama 10 detik, dibiarkan selama 10 menit. Uji positif ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil (Masaenah, 2019).

**7.3. Flavonoid.** Ekstrak simplisia buah belimbing wuluh sebanyak 3 gram ditambah 10 ml air kemudian dipanaskan selama 5 menit lalu disaring dan filtrat ditambahkan 500 serbuk magnesium dan 2 tetes HCl. Kemudian tambahkan 2 ml amil alkohol. Hasil ditunjukkan dengan munculnya warna merah tua di lapisan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Masaenah, 2019).

**7.4. Steroid dan Triterpenoid.** Ekstrak simplisia buah belimbing wuluh sebanyak 1 gram ditambah etanol, dan disaring. Filtratnya dipanaskan hingga kering. Kemudian ditambahkan 1 ml dietil eter, aduk hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan 1 tetes asam sulfat, dan 1 tetes asam asetat anhidrat. Hasil uji positif steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan. Hasil uji positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna ungu kemerahan (Masaenah, 2019).

**7.5. Kuinon.** Ekstrak simplisia buah belimbing wuluh sebanyak 1 gram ditambahkan metanol, dipanaskan, dan disaring. Filtratnya ditambah 3 tetes NaOH 10 %. Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna merah (Masaenah, 2019).

**7.6. Alkaloid.** Ekstrak simplisia buah belimbing wuluh sebanyak 1 gram ditambah 2 tetes NH<sub>3</sub> dan 5 ml kloroform, kemudian disaring. Filtratnya ditambahkan asam sulfat 2 M. Lapisan asam yang terbentuk ditetesi dengan 3 pereaksi. Uji positif alkaloid dengan larutan pereaksi *Dragendorff* akan menghasilkan warna oranye, larutan pereaksi *Mayer* akan menghasilkan warna putih, dan pereaksi *Wagner* akan menghasilkan warna coklat.

**7.7. Uji Bebas Etanol.** Pengujian bebas etanol dilakukan untuk menentukan bahwa ekstrak tersebut sudah tidak mengandung etanol. Pengujian bebas etanol dilakukan dengan uji esterifikasi. Ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat ke dalam 2 mg ekstrak kemudian dipanaskan. Hasil positif bebas etanol ditunjukkan dengan tidak terbentuk bau ester yang khas (DepKes, 1995).

## **8. Formulasi emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)**

Langkah pertama dalam membuat sediaan emulgel dengan ekstrak etanol buah belimbing wuluh adalah untuk menentukan formulasi yang akan digunakan. Komponen pembuatan sediaan emulgel berbahan dasar ekstrak etanol buah belimbing wuluh dengan mengacu pada penelitian oleh Daud (2017) dimana hasil yang diperoleh pada penelitian ini mampu menghasilkan sediaan emulgel dengan kualitas fisik yang baik, stabilitas yang baik.

**Tabel 1 Rancangan formula emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh**

Bahan	Fungsi	Konsentrasi%					
		F0	F0	F0	F1	F2	F3
Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh	Bahan Aktif	-	-	-	2,5	2,5	2,5
HPMC	<i>Gelling agent</i>	1	3	5	1	3	5
Parafin cair	Emolien	5	5	5	5	5	5
Span 80	Pengemulsi	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
Tween 80	Pengemulsi	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08
Propil paraben	Pengawet	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Metil paraben	Pengawet	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Propilen glikol	Humektan	10	10	10	10	10	10
Aqua <i>ad</i>	Pelarut	100	100	100	100	100	100

Keterangan:

F0: Formula dengan konsentrasi HPMC 1%, 3%, dan 5%

F1: Formula dengan konsentrasi HPMC 1% + ekstrak

F2: Formula dengan konsentrasi HPMC 3% + ekstrak

F3: Formula dengan konsentrasi HPMC 5% + ekstrak

Formula emulgel dibuat sesuai dengan formula pada Tabel 1, membuat basis emulgel dengan membuat fase minyak dan fase air terlebih dahulu. Fase minyak dibuat dengan mencampurkan span 80, paraffin cair, dan propil paraben kemudian dilebur pada suhu 70°C. Fase air dibuat dengan mencampurkan tween 80 dengan air panas pada suhu 70°C. Fase minyak ditambahkan ke dalam fase air pada suhu 70°C sambil terus diaduk hingga terbentuk emulsi. Basis gel dibuat dengan cara melarutkan HPMC sedikit demi sedikit dengan air panas dan diaduk hingga terbentuk gel. Metil paraben ditambahkan propilenglikol

kemudian diaduk hingga larut kemudian di campur dengan gel. Basis emulgel dan gel dicampur kemudian digerus sampai terbentuk emulgel yang homogen. Ekstrak etanol buah belimbing wuluh ditambahkan sedikit demi sedikit dalam sediaan emulgel aduk hingga homogen kemudian masukkan ke dalam wadah sediaan (Paramawidhita, 2019).

## **9. Evaluasi sediaan mutu fisik emulgel ekstrak buah belimbing wuluh**

**9.1. Uji Organoletis.** Dilakukan pengamatan pemeriksaan organoleptis melalui cara dilihat secara langsung meliputi : bentuk, bau, warna dan tekstur sediaan (Yuniarsih *et al.*, 2020).

**9.2. Uji Homogenitas.** Uji homogenitas dapat dilakukan dengan menimbang 0,1 gram sampel uji, ditempatkan di antara dua kaca object. Dicari partikel kasar atau ketidakrataan di bawah kaca. Uji homogenitas dilakukan untuk melihat apakah ada campuran yang tidak tercampur dengan baik (Depkes RI, 1979).

**9.3. Uji pH.** Pengukuran pH menggunakan pH universal atau pH meter. pH universal atau pH meter dimasukkan kedalam larutan, hasil angka pH akan muncul di instrumen pH meter dan di pH universal, dicocokkan hasil indikator lalu dicatat hasilnya (Yuniarsih *et al.*, 2020). Kisaran pH 4.5-6.5 dianggap dapat diterima untuk menghindari iritasi pada kulit wajah (Noor dan Desy, 2009).

**9.4. Uji Daya Sebar.** Emulgel sebanyak 0,5 gram diletakkan pada tengah-tengah kaca bundar berskala, kemudian ditutup dengan kaca bundar lainnya yang sudah ditimbang lalu di biarkan selama 1 menit dan dihitung diameter sebarannya. Beban 50 gram di tambahkan diatas kaca dan dibiarkan selama 1 menit lalu dihitung diameter sebarannya. Diberikan beban dengan kelipatan 50 gram sampai skala stabil lalu diukur diameter sebarannya (Kusumawati, 2018).

**9.5. Uji Viskositas.** Viskositas adalah parameter uji untuk menentukan fluiditas/viskositas suatu sediaan. Pengukuran viskositas emulgel diukur menggunakan viskometer Rion VT 0.4F. Sampel yang akan diuji dimasukkan ke dalam wadah. Di set alat, dengan spindel yang sesuai diposisikan di tengah wadah. Kemudian alat dinyalakan, maka spindel akan berputar. Rotasi poros menyebabkan indikator viskositas otomatis bergerak ke kanan. Dibaca viskositas pada jarum penunjuk (Yuniarsih *et al.*, 2020).

**9.6. Uji Daya Lekat.** Emulgel sebanyak 0,5 gram diletakkan ditengah *object glass* dan satu *object glass* lainnya digunakan untuk

menutup. Beban 50 gram diletakkan diatas *object glass* tersebut selama 5 menit. Ujung 2 *object glass* dijepit dengan alat uji, kemudian penyangga beban di lepas. Waktu lekat sediaan dihitung dari lamanya dua *object glass* terlepas dari alat uji (Sari *et al.*, 2018).

**9.7. Uji Stabilitas Dipercepat.** Uji stabilitas sediaan dilakukan dengan metode *cycling test*. Metode ini dilakukan dengan menyimpan sediaan pada suhu  $\pm 4^{\circ}$  C dalam waktu 24 jam. Sediaan uji dipindahkan ke suhu  $40^{\circ}$  C dari waktu ke waktu 24 jam (satu siklus). Pengujian sediaan dilakukan dengan 6 siklus (Indriaty *et al.*, 2019). Setelah siklus selesai, sediaan di uji organoleptis, uji pH, uji viskositas, uji daya lekat, uji daya sebar, dan uji homogenitas.

## 10. Penyiapan Sterilisasi

**10.1. Sterilisasi Alat.** Semua alat yang digunakan dalam penelitian dicuci dan dikeringkan. Kemudian dibungkus dengan kertas perkamen. Peralatan seperti tabung reaksi dan erlenmeyer pertamata dilapisi dengan kapas bersih. Alat yang akan digunakan disterilkan dalam oven pada suhu  $180^{\circ}$ C selama 2 jam. Dan aquades yang digunakan harus steril, sterilisasi aquadest dilakukan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}$ C selama 15 menit pada tekanan 2 atm (Pangalinan, R. *et al.*, 2015).

**10.2. Sterilisasi Media.** Media yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dibungkus dengan kertas. Kemudian buka tutup *autoclave* dan aluminium, kemudian media dimasukkan ke dalam *autoclave*, *autoclave* ditutup rapat, kemudian dikunci dengan kuat. Ditunggu sampai *autoclave* mencapai  $121^{\circ}$ C selama 15 menit, kemudian dibuka tutup/klem *autoclave* dan uap dikeluarkan dari *autoclave* dan media yang telah disterilkan juga dikeluarkan, kemudian didinginkan kemudian dicairkan hingga mencair, media siap digunakan (Lolok *et al.*, 2020).

## 11. Pembuatan Media

**11.1 Pembuatan media *Manitol Salt Agar* (MSA).** 10,8 gram MSA dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dengan 100 ml aquadest. Dipanaskan hingga mendidih. Media dituangkan ke dalam tabung reaksi, disterilkan dalam autoklaf. (Widianingsih, 2019).

**11.2 Pembuatan media *Nutrient agar* (NA).** Timbang 2 gram NA. Ditambahkan 100 ml aquadest dan didihkan. Media dituangkan pada tabung reaksi dan dimasukkan ke dalam autoklaf untuk sterilisasi. Media NA digunakan untuk menginokulasi bakteri pada media agar miring (Widianingsih, 2019).

## 12. Identifikasi bakteri *S. aureus*

**12.1 Identifikasi bakteri *S. aureus* dengan isolasi pada media MSA.** Isolasi bakteri dalam media MSA dilakukan dengan mengambil satu ose *S. aureus* dari suspensi bakteri, diinokulasi dengan media MSA dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Dewi, 2013). Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna media yang awalnya berwarna merah menjadi kuning (Hayati *et al.*, 2019).

**12.2 Identifikasi morfologi *S. aureus* dengan pewarnaan gram.** Sifat Gram dan morfologi bakteri dapat dilihat dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan ini dilakukan dengan menggoreskan bakteri uji pada *object glass* dan difiksasi diatas api bunsen. Kemudian ditetesi dengan *crystal violet* diamkan selama 1 hingga 2 menit. Dibersihkan sisa zat warna, lalu bilas dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan larutan Lugol, diamkan selama 30 detik. Bilas dengan air mengalir. Preparat di lunturkan dengan alkohol 96% sampai tidak ada pewarna dan dicuci di bawah air mengalir. Zat warna safranin ditetaskan, diamkan selama 2 menit bilas preparat dengan air mengalir tunggu sampai kering. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa 100x. (Hayati dkk., 2019). Positif untuk *S. aureus* yang diketahui. Berdasarkan hasil bakteri gram positif kokus membentuk kelompok yang mirip anggur, berwarna ungu di bawah mikroskop pada pembesaran lensa 100x.

**12.3 Identifikasi fisiologi uji biokimia dengan uji katalase.** Uji katalase digunakan untuk mengidentifikasi genus *S. aureus*, cairan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ditetaskan ke *object glass* dan satu ose Inokulum MSA ditambahkan ke *object glass* kemudian di homogenkan. Uji katalase positif menunjukkan adanya gelembung gas (O<sub>2</sub>) yang diperoleh dari genus *Staphylococcus* (Hayati *et al.*, 2019).

**12.4 Pengujian koagulase.** Uji koagulase dilakukan untuk mengetahui terlepas dari ada atau tidaknya enzim koagulase yang dapat dihasilkan oleh *S. aureus*. Uji koagulase dilakukan dengan mengambil sampel bakteri kemudian dimasukkannya ke dalam 1 mL media BHI dilanjutkan dengan inkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 ml plasma kelinci diikuti dengan inkubasi selama 4 jam pertama untuk melihat hasilnya. Apabila belum menunjukkan koagulase positif, lanjutkan inkubasi selama 24 jam. Hasil tes koagulase positif dengan gumpalan ditabung dan hasilnya negatif jika tidak ada gumpalan meyerupai agar-agar (SNI, 2015).

### 13. Peremajaan bakteri

Dari kultur murni *S. aureus* diambil satu ose secara aseptik dan digoreskan dalam media miring, kemudian diinkubasi dengan suhu 37° C dalam waktu 24 jam (Wijayanti dan Safitri, 2018).

### 14. Pengujian aktivitas antibakteri

**14.1 Pembuatan suspensi bakteri uji.** Dibuat suspensi bakteri *S. aureus* dengan mengambil 1 ose bakteri dan dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi media BHI. Suspensi dihomogenkan dengan cara *divortex*, kemudian disamakan kekeruhannya menggunakan standar *McFarland 0.5* (Agustin *et al.*, 2018).

**14.2 Pembuatan media Muller Hinton Agar (MHA).** 3,8 gram MHA ditimbang dan ditambahkan 100 ml aquadest. Dihomogenkan dan dipanaskan sampai mendidih. Dituang media ke dalam tabung dan dilanjutkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C untuk mensterilkan media (Mahmudah, 2017).

**14.3 Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah belimbing wuluh.** Uji aktivitas antibakteri ekstrak belimbing wuluh. Media MHA diinokulasi dengan bakteri *S. aureus* menggunakan kapas lidi steril dengan cara menggoreskan media sebanyak tiga kali pada seluruh permukaan media. Media yang telah diinokulasi bakteri dibuat 7 lubang sumuran dengan alat tip mikropipet, masing-masing sumuran diisi ekstrak etanol buah belimbing wuluh dengan konsentrasi 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, dan 10%, larutan kontrol positif klindamisin solution 1,2% dan kontrol negatif DMSO 5%. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Kemudian ukur setiap zona hambat di sekitar sumur dengan jangka sorong (Lubis, R. R. dan Marlisa, D. D. W., 2020).

**14.4 Pengujian aktivitas antibakteri emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh.** Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram *disk*. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan merendam cakram *disk* pada sediaan yang akan diuji. Suspensi bakteri diambil menggunakan kapas lidi steril kemudian diinokulasikan pada media MHA. Cawan petri dibuat menjadi 7 bagian menggunakan spidol pada bagian belakang cawan petri, setiap bagian garis diletakkan cakram dik sesuai dengan formula sediaan emulgel yang akan di uji. Formula 0 (kontrol negatif) merupakan basis gel tanpa ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), Formula 1 dengan konsentrasi ekstrak 2,5% dan HPMC 1%, Formula 2 dengan konsentrasi ekstrak

2,5% dan HPMC 3%, Formula 3 dengan konsentrasi ekstrak 2,5% dan HPMC 5%., Kontrol positif menggunakan emulgel pembanding. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Fitriyanti *et al.*, 20019).

Inkubasi pada suhu 37° C selama 18 jam dalam incubator. Pengamatan zona hambat dilakukan dengan mengukur zona bening yang terbentuk (Indarto *et al.*, 2019). Diameter zona bening yang terbentuk diukur secara horizontal dan vertikal menggunakan jangka sorong dengan satuan millimeter (mm). Hasil pengukuran zona bening menentukan kekuatan daya antibakterinya. Kategori kekuatan daya antibakteri dengan zona hambat 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah, zona hambat 5-10 mm termasuk kategori sedang, zona hambat 10-20 termasuk kategori kuat, dan zona hambat 20 mm lebih termasuk kategori sangat kuat (Khairani *et al.*, 2019).

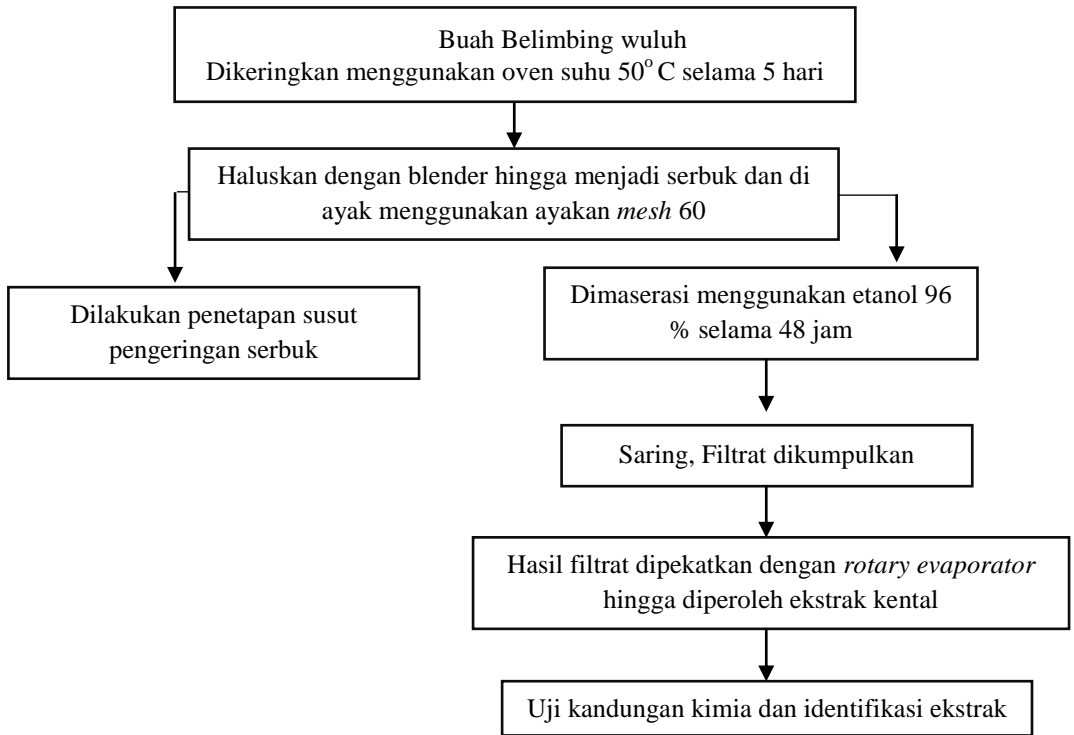
### **E. Analisis Data**

Hasil penelitian diperoleh data emulgel yang meliputi uji organoleptis, uji pH, uji viskositas, uji daya lekat, daya sebar, uji homogenitas, uji stabilitas sediaan emulgel. Metode statistik digunakan untuk menganalisis data menggunakan uji *Shapiro-wilk*. Terdistribusi normal dan homogen jika ( $p > 0,05$ ) dilanjutkan dengan ANOVA dan jika tidak berdistribusi normal ( $p < 0,05$ ) dilanjutkan uji *Uji Kruskal-Wallis*, sedangkan uji stabilitas untuk masing-masing formula dianalisis dengan uji *T-Test* (Puspitasari, 2014).

Metode *Shapiro-wilk* digunakan sebagai uji untuk melihat pengaruh emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) pada konsentrasi HPMC 1%, 3%, dan 5% dengan mengukur zona hambat terhadap *S. aureus* bakteri. Jika sesuai dengan distribusi normal ( $p > 0,05$ ), hasilnya dianalisis dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) pada kisaran 95% dan jika tidak berdistribusi normal, hasilnya dianalisis dengan *Uji Kruskal-Wallis*. Selain itu, uji *Tukey* dilakukan untuk menentukan konsentrasi mana yang berpengaruh. Uji stabilitas dianalisis menggunakan uji *T-Test*.

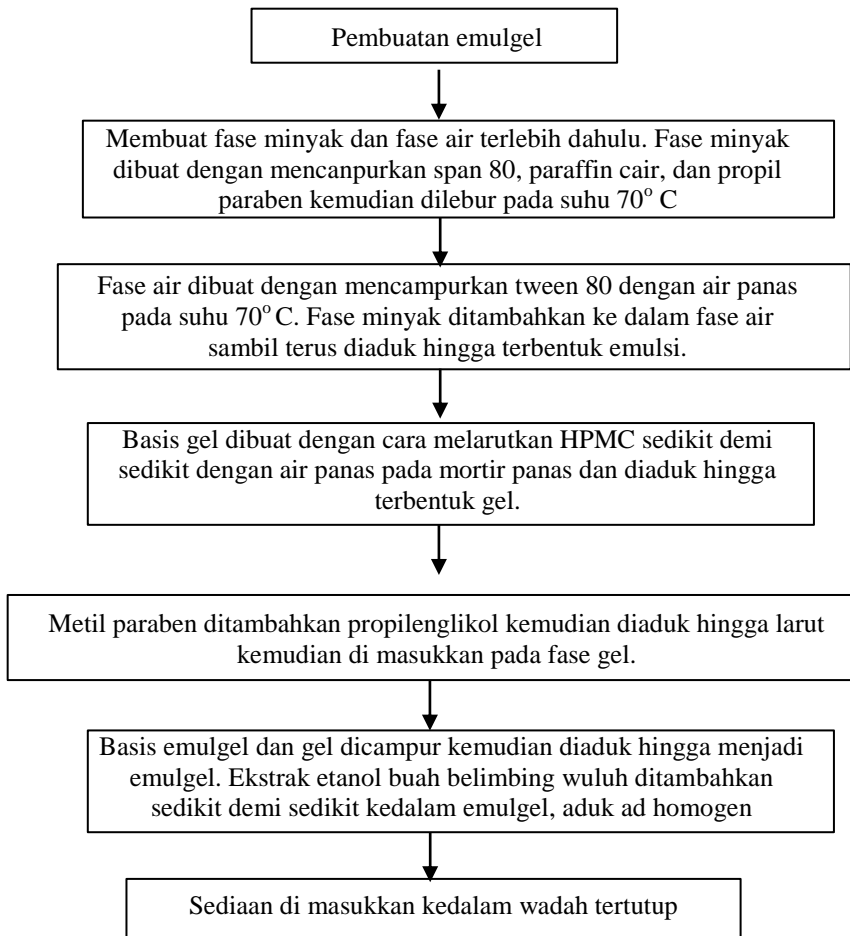
## F. Skema Rancangan Jalannya Penelitian

### 1. Pembuatan ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Avverhoa bilimbi L.*)



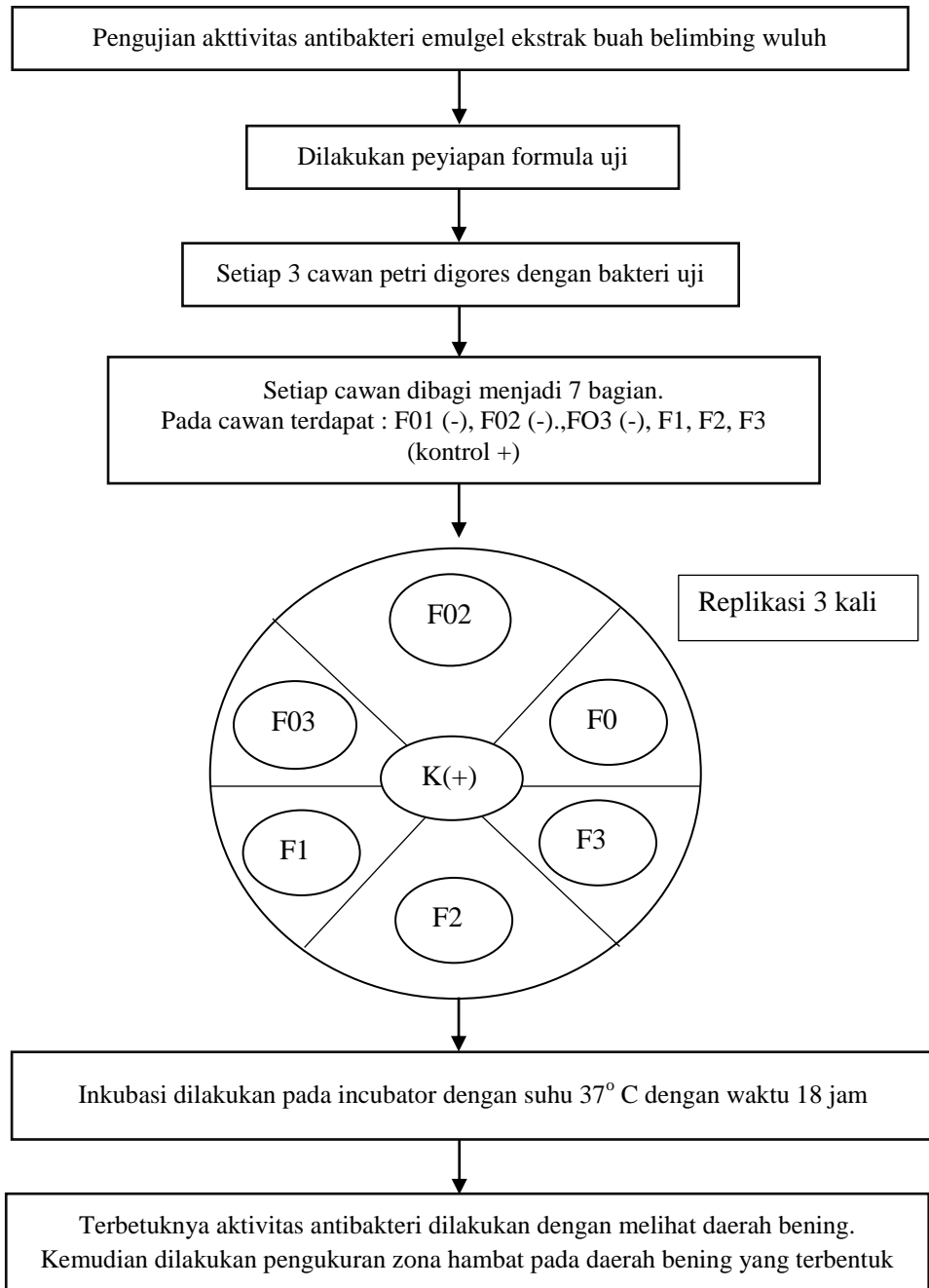
Gambar 10. Pembuatan ekstrak etanol buah belimbing wuluh

## 2. Pembuatan emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Avverhoa bilimbi L.*)



**Gambar 11. Pembuatan emul ekstrak etanol buah belimbing wuluh**

**3. Skema Pengujian aktivitas antibakteri emulgel ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Avverhoa. bilimbi L.*) metode difusi cakram *disk***



**Gambar 12. Skema Pengujian emulgel Ekstrak Buah Belimbing Wuluh**