

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan objek yang digunakan sebagai sasaran penelitian. Populasi yang pertama digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman rimpang lengkuas merah yang diperoleh dari Balai Besar dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Maret. Populasi kedua dipenelitian adalah emulgel dari ekstrak rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum).

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini yaitu sampel pertama dalam penelitian ini yaitu lengkuas merah diambil dengan kondisi rimpang masih segar, tidak rusak dan, tidak terkena penyakit. Sampel kedua dari penelitian ini yaitu ekstrak rimpang lengkuas merah dan sediaan emulgel dari ekstrak rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) yang diformulasikan dengan berbagai variasi konsentrasi gelling agent HPMC 2%, 3%, dan 4%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% rimpang lengkuas merah.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel ekstrak rimpang lengkuas merah dengan variasi konsentrasi HPMC sebagai *gelling agent*.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri sediaan emulgel ekstrak rimpang lengkuas merah terhadap *S. aureus*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel yang dapat diubah dengan tujuan untuk mengetahui atau mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung disebut variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi HPMC dalam pembuatan sediaan emulgel.

Variabel tergantung merupakan titik pusat permasalahan yang dapat disebut sebagai pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu zona hambat sediaan emulgel ekstrak rimpang lengkuas merah terhadap *S. aureus*, pengujian mutu fisik emulgel, dan stabilitas emulgel.

Variabel terkendali merupakan variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung, sehingga memerlukan ditetapkan kualifikasinya. Variabel terkendali dalam penelitian ini meliputi ekstrak rimpang lengkuas merah, waktu inkubasi bakteri, alat dan bahan yang digunakan, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, peneliti, dan formulasi emulgel.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, rimpang lengkuas merah adalah bagian akar tanaman dari tanaman rimpang lengkuas merah yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk rimpang lengkuas merah adalah serbuk yang diperoleh dari hasil proses pengeringan, penghalusan, dan pengayakan rimpang lengkuas merah.

Ketiga, ekstrak rimpang lengkuas merah adalah ekstrak hasil ekstraksi rimpang lengkuas merah menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 55°C.

Keempat, sedian emulgel ekstrak rimpang lengkuas merah dengan variasi konsentrasi *gelling agent* HPMC yang berbeda-beda.

Kelima, parameter evaluasi mutu fisik emulgel yang akan diuji meliputi identifikasi organoleptis, homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat, tipe emulsi, dan stabilitas emulgel.

Keenam, bakteri uji dalam penelitian adalah *Staphylococcus aureus* dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu oven, blender, ayakan no 60, *moisture balance*, botol kaca gelap, wadah ekstrak, kain flannel, kertas saring, timbangan analitik, *vacum rotary evaporator*, tabung teaksi, rak tabung reaksi, pipet, mortir, stamfer, pot salep untuk sediaan gel, *object glass*, *degglass*, kaca arloji, gelas ukur,

batang pengaduk, buncen, pH meter, *viscotester Brookfield*, jarum ose, cawan petri, mikroskop, kapas lidi steril, bor prop, jangka sorong dan penggaris, spidol, beaker glass 100 ml, sudip, kapas swab steril, kapas, *autoklaf*, kompor, erlemeyer, kurs porslen, desikator, labu alas bulat, inkubator, dan labu destilasi.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah HPMC, span 80, tween 80, paraffin cair, propilen glikol, *phenoxyetanol*, aquadest, DMSO 10%, asam asetat, asam asetat pekat, asam sulfat, asam sulfat pekat, asam, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, pereaksi bouchardat, HCl pekat, serbuk Mg, FeCl₃ 1%, HCl 2N, asam sitrat, methylene blue, klindamisin 1%, kalium telurit 1%, NaCl 0,9%, media, media VJA, media MHA, media NA, kristal violet, lugols iodin, alkohol 70%, safranin, toluene, dan plasma darah kelinci.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Dalam penelitian ini, langkah pertama adalah memastikan kebenaran sampel tanaman rimpang lengkuas merah. Ini dilakukan dengan mencocokkan morfologi tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi. Ini dilakukan untuk menghindari kesalahan pada tanaman yang akan diteliti pada tahap ini. Proses pengambilan keputusan dilakukan di UPF Yankestrat Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan Bahan

Tanaman lengkuas merah diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang digunakan adalah rimpang tanaman yang masih segar agar menghasilkan ekstrak yang bagus dan ditimbang keseluruhan bahan segarnya.

3. Pengeringan Rimpang lengkuas merah

Rimpang lengkuas merah disortir dan dicuci menggunakan air mengalir supaya kotoran yang menempel dapat hilang. Kemudian rimpang lengkuas merah yang telah bersih dikeringkan dibawah sinar matahari selama 7 hari dan ditutup kain hitam.

4. Pembuatan Serbuk Rimpang lengkuas merah

Simplisia yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan mesin penggiling hingga menjadi serbuk. Kemudian serbuk diayak menggunakan ayakan no 60 dengan tujuan mendapatkan serbuk dengan derat kehalusan yang relatif homogen. Selanjutnya serbuk disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat. Serbuk yang diperoleh ditimbang kembali untuk mendapatkan bobot persen kering terhadap persen bobot basah.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot simplisia kering}}{\text{berat serbuk}} \times 100\%$$

5. Pemeriksaan Mutu Serbuk Rimpang lengkuas merah

5.1 Pemeriksaan Organoleptis. Pemeriksaan organoleptis serbuk rimpang lengkuas merah dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau serbuk rimpang lengkuas merah.

5.2 Penetapan Susut Pengeringan Serbuk. Analisis kadar air dilakukan dengan metode gravimetri yaitu dengan menimbang sejumlah bahan basah yang kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselin yang dipanaskan dalam oven dengan suhu 105°C hingga mencapai bobot konstan yaitu perbedaan 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%. Hasil yang diperoleh dinyatakan dengan % kadar susut pengeringan.

6. Pembuatan Ekstrak Rimpang lengkuas merah

Pembuatan ekstrak rimpang lengkuas merah menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:10 melalui metode maserasi. Merasasi dilakukan dalam botol kaca gelap. Setelah 1000 gram serbuk dan 10 liter pelarut ditambahkan, didiamkan selama 24 jam. Pada 6 jam pertama, pengadukan dilakukan, dan didiamkan lagi selama 18 jam. Kemudian 6 jam dilakukan pengadukan kembali dan didiamkan lagi selama 18 jam kemudian diaduk. Setelah maserasi selesai, kain flannel dan kertas saring digunakan untuk menyaring ampas serbuk. Ampas serbuk yang dihasilkan kemudian dimerasasi lagi dengan pelarut dengan volume setengah kali jumlah pelarut pada penyarian utama atau 5 liter pelarut. Untuk menghasilkan ekstrak kental, semua hasil maserasi dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 55°C.

7. Perhitungan Rendemen

Untuk menghitung rendemen, presentase bobot (b/b) antara rendemen dan bobot serbuk simplisia yang digunakan harus mencapai

angka yang setidaknya sesuai dengan yang ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak berat (g)}}{\text{berat serbuk (g)}} \times 100\%$$

8. Pemeriksaan Mutu Ekstrak Rimpang lengkuas merah

8.1 Penetapan Kadar Air Ekstrak. Bersihkan tabung penerima dan pendingin dengan *asam pencuci*, bilas dengan air, kemudian keringkan dalam lemari pengering. Timbang saksama sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1 sampai 4 mL air, masukkan ke dalam labu kering. Jika zat berupa pasta, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejolak mendadak saat mendidih, tambahkan batu didih secukupnya. Masukkan lebih kurang 200 mL toluen jenuh air ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Masukkan toluen jenuh air ke dalam tabung penerima (E) melalui pendingin sampai leher alat penampung (B). Panaskan labu hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen jenuh air. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen jenuh air hingga tetesan air turun. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b.

8.2 Uji Bebas Etanol Ekstrak. Pemeriksaan bebas etanol bertujuan untuk memastikan ekstrak yang telah dipekatkan tidak mengandung etanol. Cara untuk uji bebas etanol adalah dengan menimbang $\pm 0,5$ g ekstrak kemudian menambahkan 1 ml asam asetat pekat dan 1 ml asam sulfat pekat pada tabung reaksi. Setelah itu dipanaskan diatas *waterbath* dan ditutup menggunakan kapas. Uji dikatakan bebas etanol apabila tidak tercium bau khas ester.

9. Identifikasi Kandungan Senyawa Ekstrak

9.1 Identifikasi Flavonoid. Ekstrak rimpang lengkuas merah dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 0,1 gram serbuk

magnesium, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amyl alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Positif flavonoid jika terbentuk warna jingga sampai merah menunjukkan adanya flavon, merah sampai jingga menunjukkan adanya flavanol, jingga hingga merah keunguan menunjukkan adanya flavonoid (Maryam *et al.*, 2020). Sedangkan tujuan penambahan HCL pekat untuk mereduksi inti benzopyron yang terdapat dalam struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium berwarna merah atau jingga (Ergina *et al.*, 2014).

9.2 Identifikasi Tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan cara 1 ml ekstrak rimpang lengkuas merah dimasukkan kedalam tabung reaksi, dan kemudian ditambahkan FeCl_3 1% sebanyak 2-3 tetes. Apabila warnanya berubah menjadi hijau kehitaman, sampel positif mengandung tanin (Cobra *et al.*, 2017).

9.3 Identifikasi Saponin. Sebanyak 0,1 g ekstrak lengkuas merah ditambahkan dengan 5 mL aquades panas lalu didinginkan. Setelah itu campuran dikocok sampai muncul buih dan didiamkan selama 2 menit. Selanjutnya campuran ditambahkan dengan 2 tetes HCl 2 N dan dikocok lagi sampai terbentuk buih yang mantap selama 10 menit. Terbentuknya buih tersebut sebagai indikator reaksi positif adanya saponin.

9.4 Identifikasi Alkaloid. Sejumlah 1 mL sampel ekstrak etanol lengkuas merah ditetes 2 mL larutan HCL 2N, lalu diaduk dan dikelompokkan kedalam tiga gelas tabung reaksi yang tidak sama pada tiap sampel. Setiap sampel pada gelas tabung reaksi ditetes sebanyak 1 tetes pelarut pelarut Dragendorf di tabung ke dua, dan pelarut Bouchardat di tabung ketiga. Terbentuknya endapan putih setelah penambahan jingga pada peambahan pelarut Dragendorf, dan endapan pelarut bouchardat. Jika ditemukan dua atau tiga pelarut diatas, maka menandakan adanya suatu Mayer di tabung ke satu, pelarut Mayer, endapan cokelat setelah penambahan endapan setelah penambahan kandungan senyawa alkaloid.

9.5 Identifikasi Steroid dan terpenoid. Ekstrak ditambahkan dengan eter lalu dipisahkan. Filtrat ditambahkan H_2SO_4 dan asam asetat anhidrat. Apabila pada sampel terkandung steroid maka warna hijau yang akan terbentuk sedangkan apabila pada sampel terkandung triterpenoid maka warna merah hingga ungu yang akan terbentuk.

10. Peremajaan Bakteri

Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara mengambil 1 ose biakan *S. aureus* murni menggunakan ose yang sudah disterilkan kemudian digoreskan perlahan dalam media NA. Hasil goresan kemudian disimpan dalam inkubator selama sekitar 24 jam pada suhu 37°C.

11. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Suspensi bakteri dibuat dengan menggunakan jarum ose steril, biakan bakteri yang telah diremajakan diambil 1-2 ose kedalam tabung reaksi berisi 5 mL larutan NaCl fisiologi steril 0,9%. Suspensi yang terbentuk disetarkan kekeruhannya dengan larutan standar *Mc Farland* No.0,5 yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Kumala et al., 2009). Tujuannya adalah agar jumlah bakteri yang digunakan selama penelitian tetap sama dan tidak terlalu banyak atau terlalu sedikit (Pratiwi et al., 2017).

12. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

12.1 Identifikasi Media Selektif. Dalam pengujian ini, suspensi *Staphylococcus aureus* diinokulasikan pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA), yang telah ditambahkan ke dalam cawan petri dengan 3 tetes larutan kalium telurit 1%. Media VJA diperkaya dengan zat kimia tertentu yang membantu perkembangan bakteri *Staphylococcus aureus*. Selama 24 jam, media diinkubasi pada suhu 37°C. Pembentukan koloni hitam dan perubahan warna medium di sekitar koloni menjadi kuning adalah tanda pertumbuhan bakteri (Jawetz et al., 2007). Metode ini menunjukkan hubungan yang kompleks antara bahan kimia dalam media dan metabolisme bakteri, yang menghasilkan perubahan warna sebagai penanda pertumbuhan bakteri yang khas. Ini menunjukkan bahwa bahan kimia dalam media dapat mempengaruhi respons metabolik bakteri secara khusus, menghasilkan perubahan warna yang menjadi indikator penting keberhasilan kultur.

12.2 Identifikasi Pewarnaan Gram. Untuk mengidentifikasi pewarnaan gram, *object glass* dibersihkan dengan alkohol 95%, dilewatkan beberapa kali pada api bunsen, dan ditunggu sampai sedikit dingin. Bakteri diambil secara aseptis menggunakan jarum ose, dan kemudian dioleskan tipis pada *object glass*. Untuk memastikan bahwa sampel tidak terlalu panas, spesimen dipanaskan tiga kali dengan api bunsen. Pewarnaan dilakukan dengan meneteskan 2-3 tetes kristal violet (Gram A sebagai pewarna utama) diamkan selama 1 menit.

Buang kristal violet yang tersisa dan bilas dengan aquadest yang mengalir. Selanjutnya, tetesi 2-3 tetes lugols iodine (Gram B sebagai mordant) diamkan selama 1 menit, lalu bilas kembali dengan aquadest mengalir dan keringkan. Lakukan dekolorasi dengan meneteskan alkohol 70% (Gram C) selama sekitar 45 detik. Kemudian cuci dengan aquadest mengalir. Selanjutnya, tetes safranin (Gram D sebagai penutup atau cat lawan) dan diamkan selama 1 menit. Cuci dengan aquadest mengalir dan angin-anginkan. Hasil yang memiliki warna ungu dan bakteri berbentuk bulat (kokus) menunjukkan positif *S. aureus*. Tujuan pewarnaan bakteri ini adalah untuk mengetahui bagaimana morfologi dan sifat sel bakteri dipengaruhi oleh pewarnaan.

12.3 Identifikasi Biokimia. Uji katalase dilakukan untuk membedakan genus *Staphylococcus sp.* dan *Streptococcus sp.* dengan memasukkan 1 ose biakan bakteri ke objek kaca dan meneteskan 2 tetes H_2O_2 3%. Hasil menunjukkan positif jika genus *Staphylococcus sp.* menghasilkan gelembung gas (O_2) (Hayati *et al.*, 2019). Pengujian katalase dilaksanakan dengan tujuan untuk mengidentifikasi keberadaan enzim sitokrom oksidase.

Adanya koagulase bebas adalah tujuan dari pengujian koagulase. Caranya 200 μl plasma darah kelinci dicampur dengan larutan asam sitrat yang telah diencerkan dalam rasio 1:5. Satu ose kultur *Staphylococcus aureus* kemudian dimasukkan ke dalam campuran. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasilnya dinilai dengan mengamati terbentuknya gumpalan setelah periode inkubasi minimal empat jam. Hasilnya dikategorikan sebagai positif apabila gumpalan plasma tidak dapat dipisahkan dari dinding tabung saat tabung dibalik yang menunjukkan bahwa gumpalan tetap melekat pada dinding tabung secara konsisten. Gumpalan yang terbentuk selama prosedur menunjukkan adanya koagulase, yang menunjukkan infeksi *Staphylococcus aureus*. Proses ini sangat penting untuk menentukan infeksi berbasis koagulase dan untuk menilai respons imun tubuh terhadap patogen.

13. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah

Metode sumuran digunakan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk mengukur aktivitas antimikroba. Bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi secara merata pada permukaan agar dalam bentuk zig-zag, mencakup seluruh permukaan media. Setelah proses inokulasi

selesai, sumur kecil dibuat pada bahan yang telah terkontaminasi oleh bakteri. Setelah itu, sumur yang telah dibuat dimasukkan ke dalam ekstrak etanol rimpang lengkuas merah yang telah diencerkan dalam DMSO 5%. Dalam uji ekstrak, ekstrak etanol rimpang lengkuas merah dengan konsentrasi 2,5%;5%;10%, DMSO 10% digunakan sebagai kontrol negatif, dan klindamisin digunakan sebagai kontrol positif. Masing-masing larutan uji diteteskan pada lubang sumuran dengan menggunakan mikropipet sebanyak 50 μ l, dilanjutkan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk mengukur lebar zona hambat, jangka sorong digunakan. Untuk memastikan bahwa hasilnya konsisten, pengujian dilakukan tiga kali. Aktivitas antimikroba ekstrak yang diuji dinilai dengan menganalisis data statistik.

14. Formulasi Emulgel

Rancangan formulasi emulgel antibakteri esktrak rimpang lengkuas merah yang divariasi dengan konsentrasi HPMC dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rancangan formula emulgel yang telah dimodifikasi yang mengacu pada penelitian (Larasati, 2024)

Bahan	Formula (%)			
	F1	F2	F3	F4
Ekstrak rimpang lengkuas merah	10	10	10	-
HPMC	2	3	4	2
Propilen glikol	10	10	10	10
Paraffin cair	5	5	5	5
Tween 80	1,08	1,08	1,08	1,08
Span 80	0,42	0,42	0,42	0,42
Phenoxyetanol	0,8	0,8	0,8	0,8
Aquadest ad	100	100	100	100

Keterangan:

F1: Formulasi emulgel variasi konsentrasi HPMC 2% dengan ekstrak

F2: Formulasi emulgel variasi konsentrasi HPMC 3% dengan ekstrak

F3: Formulasi emulgel variasi konsentrasi HPMC 4% dengan ekstrak

F4: Formulasi emulgel variasi konsentrasi HPMC 2% tanpa ekstrak

15. Pembuatan Emulgel

Emulgel dirancang dengan empat variasi formula, dimana pengembangan formula dilakukan dengan memanfaatkan HPMC hingga mencapai hasil yang optimal. Variasi konsentrasi HPMC adalah 2%, 3%, dan 4%, masing-masing untuk sediaan 100 gram, dengan tiga formulasi mengandung ekstrak etanol rimpang lengkuas merah dan satu formulasi tanpa ekstrak. Semua bahan yang diperlukan dipersiapkan dengan menimbang sesuai formulasi. Basis gel HPMC dibuat dengan cara menambahkan HPMC secara bertahap ke dalam air panas pada

suhu 80°C, kemudian didiamkan selama 30 menit hingga HPMC mengembang, selanjutnya digerus hingga terbentuk basis gel. Massa emulsi disiapkan dengan memanaskan fase minyak (parafin cair, span 80, dan phenoxyetanol) pada suhu 70°C. Secara bersamaan, fase air (tween 80) juga dipanaskan. Setelah kedua fase panas, keduanya dicampurkan dan digerus hingga membentuk emulsi, kemudian dicampurkan dengan basis gel hingga homogen. Ekstrak etanol rimpang lengkuas merah digerus dalam mortir panas bersama dengan propilen glikol hingga mencair, kemudian dimasukkan ke dalam mortir berisi emulgel dan diaduk hingga tercampur merata. Prosedur ini diulang sebanyak tiga kali untuk masing-masing formula, termasuk formulasi dan sediaan emulgel kontrol tanpa ekstrak etanol lengkuas merah.

16. Pembuatan Kontrol

16.1 Kontrol Positif. Kontrol positif yang digunakan adalah Klindamisin.

16.2 Kontrol Negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah basis emulgel tanpa mengandung ekstrak rimpang lengkuas merah.

17. Evaluasi Mutu Fisik Sediaan Emulgel

17.1 Uji Organoleptis. Perubahan ditunjukkan secara organoleptik dalam bentuknya. Observasi bentuk, warna, dan bau sediaan pada suhu kamar.

17.2 Uji Homogenitas. Mengambil sediaan emulgel sebanyak 0,5 g, kemudian diletakkan pada salah satu ujung *object glass*, lalu diratakan. Sediaan dianggap homogen jika tidak ada butiran kasar pada kaca (Naibaho *et al.*, 2013).

17.3 Uji pH. Sediaan uji diukur pHnya dengan elektroda pH meter kalibrasi dengan larutan dapar pH 7. Aquadest digunakan untuk mencuci elektroda. Setelah itu, elektroda diangin-anginkan hingga mengering, lalu dimasukkan kedalam sediaan emulgel. Setelah elektroda tidak digunakan, layar pH meter menunjukkan nilai konstan. Nilai pH harus antara 4,5-6,5 menurut SNI No. 06-2588 (Ida dan Noer, 2012).

17.4 Uji Viskositas. Untuk mengukur viskositas, menggunakan viscotester, setiap formula direplikasi tiga kali. Setelah sampel sebanyak 100 g dimasukkan kedalam mangkok viscotester, putar nomor 7 dengan 100 rpm dan rotor diputar. Jika jarum menunjukkan angka konstan akan menunjukkan nilai viskositas. Proses pengukuran

viskositas dilakukan setiap minggu selama periode satu bulan (Bayuaji et al., 2012). Nilai viskositas semipadat (gel) standar adalah 2000–50000 cP atau 6–50 Pa.S., menurut SNI 16-4399-1996.

17.5 Uji Daya Sebar. Pengujian daya sebar dilakukan pada alat daya sebar yang terbuat dari kaca transparan. Sediaan emulgel sebanyak 0,5 g diletakkan diatas alat selama 60 detik. Kemudian diberat dalam jumlah 50 g, 100 g, 150 g, dan 200 g. Setelah itu, menggunakan penggaris untuk mengukur diameter daerah penyebaran emulgel dari tiga sisi yang berbeda, pengukuran daya sebar dilakukan pada setiap penambahan beban (Shovyana dan Zulkarnain, 2013). Daya sebar emulgel yang baik antara 5-7 cm (Rauf *et al.*, 2021).

17.6 Uji Daya Lekat. Pengujian daya lekat dilakukan dengan meletakkan *object glass*. Setelah itu, letakkan emulgel diatas gelas dan tekan dengan beban satu kilogram. Tunggu selama 15 menit. Saat beban seberat 80 g dilepaskan, waktu dicatat menggunakan stopwatch. Untuk setiap emulgel yang diperiksa, tiga kali percobaan dilakukan. Daya lekat emulgel yang baik adalah lebih dari 1 detik (Rauf *et al.*, 2021).

17.7 Uji Tipe Emulsi. Metode kelarutan zat warna dan metode daya hantar listrik digunakan untuk menguji tipe emulsi. Dalam metode kelarutan zat warna, sediaan emulgel ditetesi dengan *metilen blue*, emulgel tipe M/A terdistribusi secara homogen dan emulgel tipe A/M tidak terdistribusi secara merata. Selanjutnya, pengujian metode daya hantar listrik dilakukan dengan mencelupkan sepasang emulgel ke dalam air. Apabila elektroda mengalami pergerakan menunjukkan bahwa sediaan memiliki tipe emulsi minyak dalam air. (Shovyana, 2013).

17.8 Uji Stabilitas. Uji stabilitas sediaan emulgel menggunakan metode *cycling test*. Metode *cycling test* dilakukan dengan cara sediaan emulgel disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian dikeluarkan dan disimpan pada suhu 40°C selama 24 jam. Waktu selama penyimpanan dua suhu dianggap satu siklus. Pengujian diulang sebanyak 6 siklus dan dievaluasi sediannya pada awal dan akhir tes siklus. Metode *cycling test* bertujuan untuk melihat kestabilan suatu sediaan dengan pengaruh variasi suhu selama waktu penyimpanan tertentu.

18. Pengujian Aktivitas Antibakteri Sediaan Emulgel

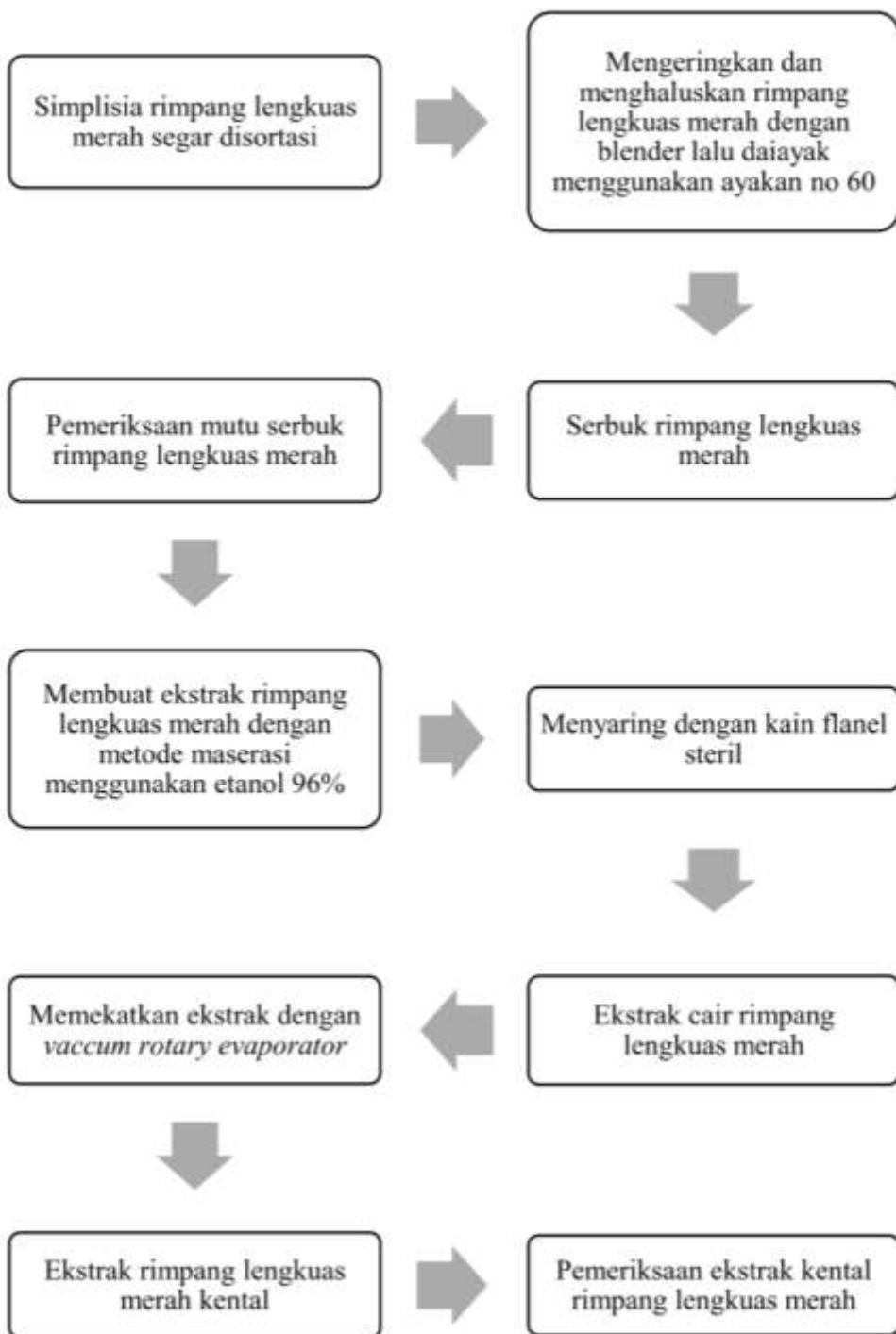
Penggunaan *Muller Hinton Agar* (MHA) sebagai media kultur bakteri menawarkan sejumlah keuntungan karena sifatnya non-selektif dan non-differensial, sehingga memungkinkan pertumbuhan berbagai jenis bakteri (Atmojo, 2016). Metode difusi sumuran diterapkan pada cawan petri steril yang telah dipersiapkan dengan media MHA, dimana lubang sumuran dibuat sebagai bagian dari prosedur. Dimulai dengan pengambilan inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* dari suspensi NaCl 0,9%, yang telah distandarisasi pada kekeruhan *McFarland* 0,5 menggunakan kapas steril. Inokulasi bakteri kemudian dilakukan pada media MHA dan dibiarkan selama 10 menit untuk memungkinkan difusi suspensi bakteri ke dalam media. Pada cawan petri sumur 1 diisi dengan emulgel ekstrak rimpang lengkuas merah F1 sebanyak 0,1 gram, sumur 2 diisi dengan emulgel ekstrak rimpang lengkuas merah F2 sebanyak 0,1 gram, dan sumur 3 diisi dengan emulgel ekstrak rimpang lengkuas merah F3 sebanyak 0,1 gram. Sumur 4, kontrol positif (+) diisi dengan antibiotik Medi-Klin Gel 1% sebanyak 0,1 gram. Sumur 5 kontrol negatif diisi dengan basis emulgel tanpa mengandung ekstrak rimpang lengkuas merah sebanyak 0,1 gram. Seluruh cawan petri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Penilaian terhadap zona yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri di sekitar sumuran menunjukkan bahwa bahan uji memiliki potensi penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri. Pengujian ini dilakukan dalam tiga replikasi untuk memastikan konsistensi hasil. Diameter zona hambat diukur dan data yang diperoleh dianalisis menggunakan metode statistik. Kontrol positif yang digunakan adalah Medi-Klin Gel 1%, yang mengandung klindamisin, sebuah agen anti jerawat yang dikenal efektif. Klindamisin, sebagai antibiotik *lincosamide*, bekerja dengan mengikat subunit ribosom 50S dan menghambat sintesis protein melalui gangguan aktivitas tRNA selama proses translasi (*National Library of Medicine*, 2013).

E. Analisis Hasil

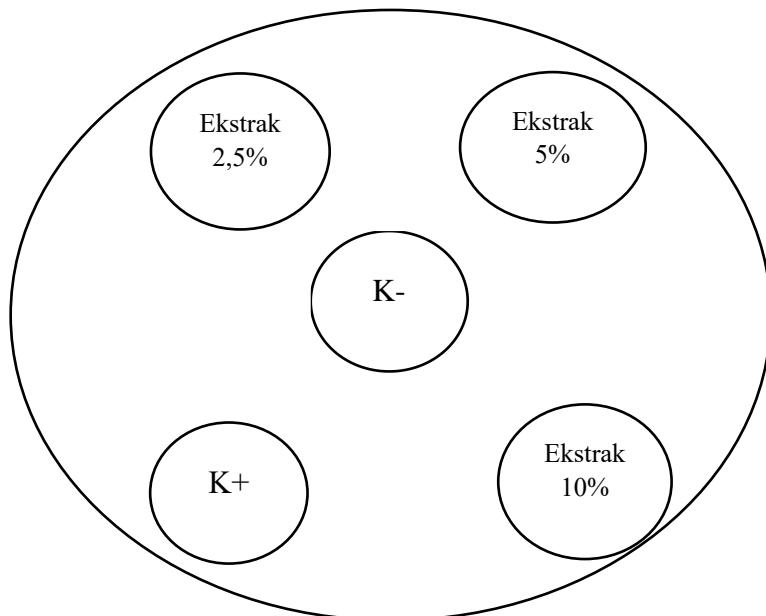
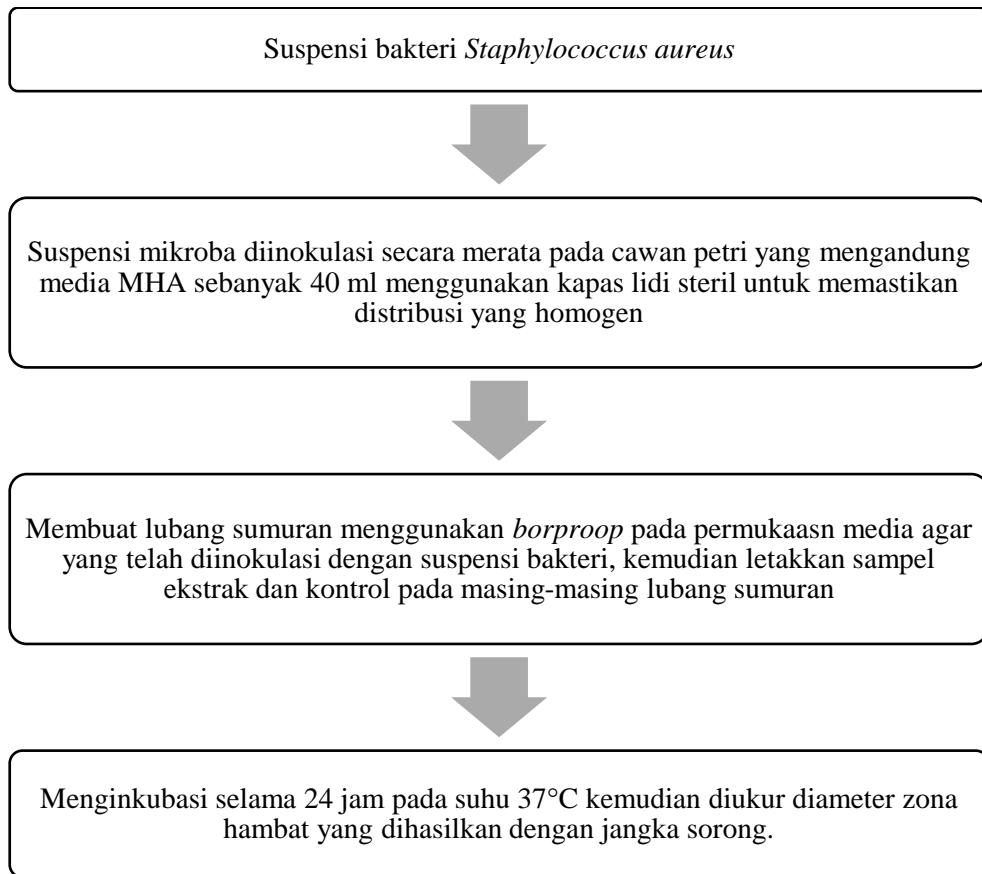
Data yang dikumpulkan meliputi viskositas, daya sebar, daya lekat, dan pH. Untuk memulai analisis, dilakukan pemeriksaan awal terhadap distribusi data menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Apabila uji ini menunjukkan distribusi normal ($p>0,05$), maka analisis selanjutnya

menggunakan uji parametrik *One Way ANOVA*. Namun, apabila data tidak mengikuti distribusi normal ($p<0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Aktivitas antibakteri, yang diukur melalui zona hambat, juga dianalisis dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk menentukan pola distribusi data. Jika data menunjukkan distribusi normal ($p>0,05$), maka analisis dilakukan dengan uji parametrik *One Way ANOVA*. Sebaliknya, jika data tidak berdistribusi normal ($p<0,05$), uji *Post-Hoc Tukey* diterapkan untuk mengevaluasi perbedaan signifikan di antara kelompok-kelompok yang dianalisis. Penentuan metode analisis ini penting untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh akurat dan valid sesuai dengan distribusi data yang ada.

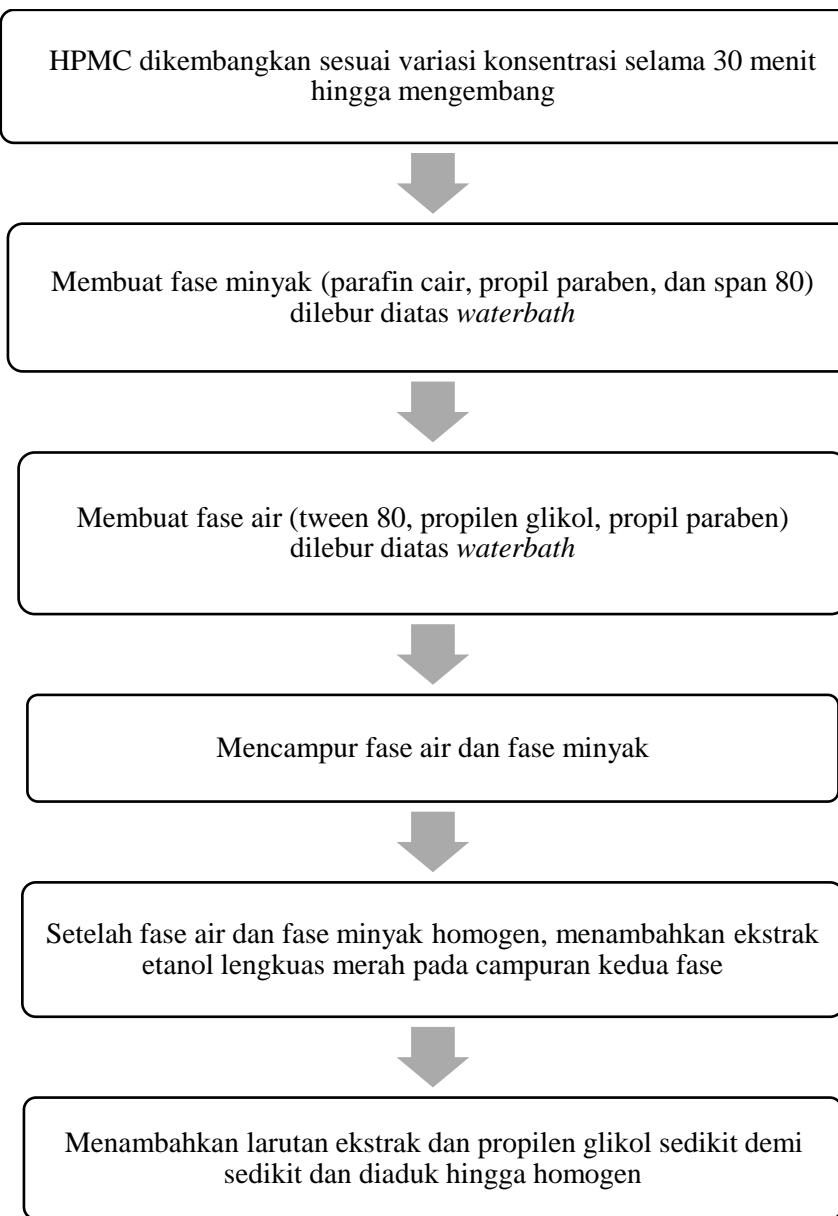
F. Skema Penelitian



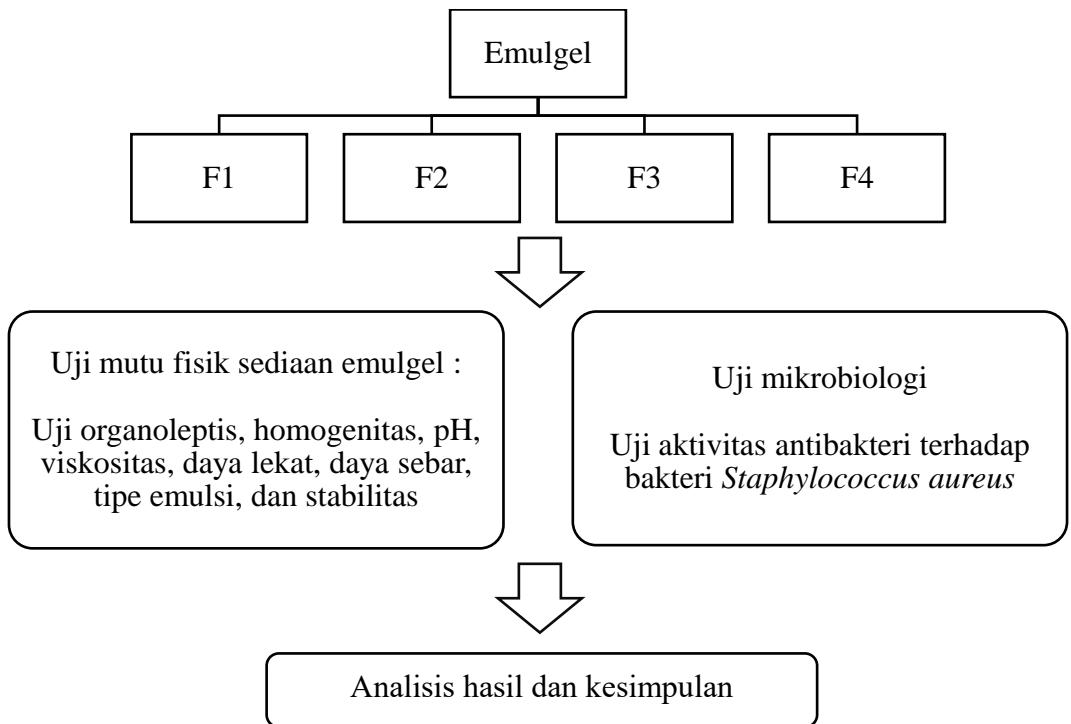
Gambar 10. Skema pembuatan ekstraksi rimpang lengkuas merah



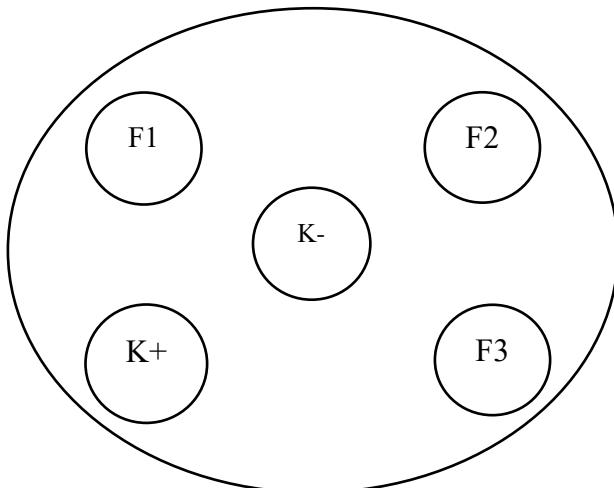
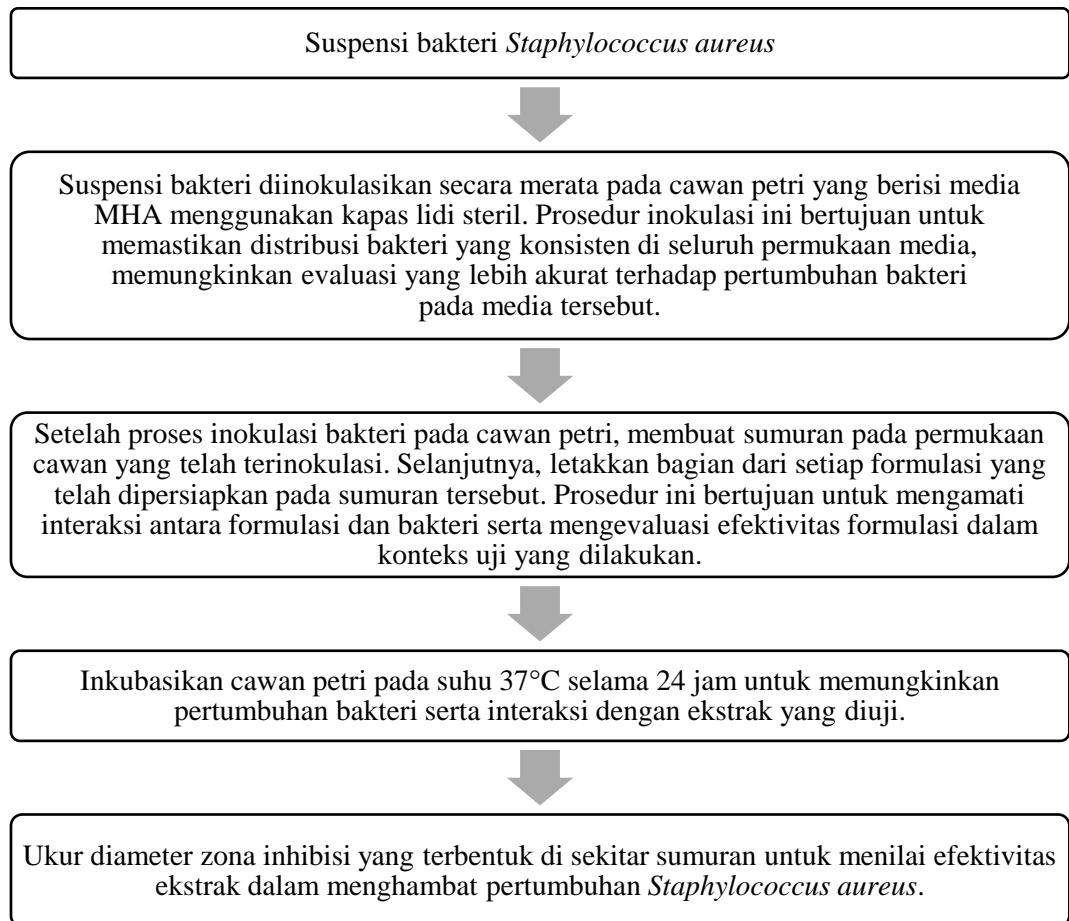
Gambar 11. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak



Gambar 12. Skema pembuatan emulgel ekstrak rimpang lengkuas merah



Gambar 13. Skema pengujian emulgel



Gambar 14. Skema pengujian aktivitas antibakteri sediaan emulgel