

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah sekumpulan objek yang memiliki ciri-ciri khusus yang menjadi fokus dalam sebuah penelitian. Populasi pada penelitian ini menggunakan biji salak pondoh yang berasal dari wilayah Malang, Jawa Timur.

Sampel sebagian dari populasi yang akan diteliti bertujuan untuk mempelajari karakteristik populasi dengan meneliti sebagian populasi bukan keseluruhan populasi. Sampel yang digunakan merupakan biji salak pondoh yang berasal dari wilayah Malang, Jawa Timur diambil dengan acak dan dipanen setelah matang benar dipohon dengan ciri permukaan kulit bersih dan mengkilap dengan sisik yang tampak lebih renggang, buah berwarna coklat gelap.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak biji salak pondoh (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) yang diperoleh dari hasil maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah sediaan emulgel dari ekstrak etanol biji salak pondoh (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) dengan konsentrasi HPMC yang berbeda-beda dan berbagai macam pengujian mutu fisik sediaan emulgel.

Variabel utama ketiga pengujian mutu fisik emulgel dilakukan dengan pengujian organoleptik, homogenitas, tipe emulgel, daya sebar, daya lekat, pH, viskositas dan stabilitas fisik emulgel.

Variabel utama keempat aktivitas antibakteri sediaan emulgel dari ekstrak biji salak pondoh dengan variasi HPMC.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama diklasifikasikan dalam dalam variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, yang termasuk variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi HPMC pada sediaan emulgel dengan variasi 2%, 2,5 % dan 3%.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah sifat fisik yang meliputi organoleptis, viskositas, daya sebar, daya lekat, homogenitas, sifat kimia (pH), dan aktivitas antibakteri emulgel ekstrak biji salak.

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah ekstrak biji salak pondoh (tempat tanaman tumbuh), komposisi campuran, metode ekstraksi, metode pembuatan emulgel, metode pengujian sifat fisik emulgel, bakteri uji *S. aureus*, proses pembuatan emulgel, alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian.

3. Definisi Operasional Variabel

Pertama, biji salak pondoh adalah biji dari buah salak yang diperoleh secara acak bebas hama diambil dari Malang, Jawa Timur.

Kedua, serbuk biji salak pondoh adalah serbuk yang telah melalui proses pengeringan dan penggilingan. Pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari selama 3 hari dan penggilingan menggunakan mesin penggiling kemudian diayak dengan pengayak nomor 40 mesh.

Ketiga, ekstrak biji salak pondoh adalah hasil dari ekstraksi biji salak pondoh menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan pelarut 1:10 yang kemudian dipekatkan menggunakan *vacum rotary evaorator*.

Ketiga, emulgel adalah sediaan yang diformulasikan dengan zat aktif yang tidak mudah larut dengan air. Variasi konsentrasi HPMC yang digunakan adalah 2%, 2,5% dan 3%.

Keempat, uji sifat fisik emulgel adalah pengujian emulgel terhadap uji organoleptik, homogenitas, tipe emulgel, viskositas, pH, daya sebar, dan daya lekat.

Kelima, uji stabilitas adalah parameter untuk mengetahui kemampuan produk dalam penyimpanan metode yang digunakan yaitu *Freeze thaw* selama 6 siklus.

Keenam, uji aktivitas antibakteri adalah pengujian aktivitas antibakteri *S. aureus* pada ekstrak biji salak pondoh dan sediaan emulgel dari ekstrak biji salak pondoh dengan variasi HPMC yang ditunjukkan dengan presentase diameter daerah hambat pada medium MHA.

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu alat maserasi, seperangkat alat destilasi toluen, batang pengaduk, pot plastik, sendok tanduk, sudip, mortir, stamper, pipet tetes, plat kaca, penangas air, kapas lidi steril, ayakan No. 40, beban timbangan, kertas saring, kaca objek glass, pisau,

tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, *beaker glass*, erlenmayer, tabung reaksi, cawan petri, cawan uap, cawan petri, kurs porselen, bunsen, ose, timbangan analitik, desikator, oven, autoklaf, LAF, inkubator, *waterbath*, pH meter, kaca objek, lempeng kaca bulat diameter 15 cm, jangka sorong, homogenizer, *vaccum rotary evaporator*, *voltmeter*, pH meter, *texture analyzer*, *spreadability tester*, viskometer *Brokfield* dan kulkas.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji buah salak pondoh *Salacca zalacca* (Gaert.) Voss yang diambil dari daerah Malang (Jawa Timur), etanol 96%, DMSO 10%, FeCl₃, HCl pekat, H₂SO₄ 1%. Bahan untuk formula emulgel terdiri dari HPMC, span 80 tween 80, paraffin cair, gliserin, metil paraben, propil paraben, propilenglikol dan *aquadest*. Bahan untuk uji aktivitas antibakteri bakteri *S. aureus*, media peremajaan yang digunakan adalah NA (*Nutriet Agar*), MHA (*Muller Hinton Agar*), dan VJA (*Vogel Johnson Agar*), infus NaCl 0,9%, kontrol positif clindamisin, serbuk Mg, pereaksi mayer, wagner dan dragendorff.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Biji salak pondoh dilakukan determinasi bertujuan untuk memastikan keaslian atau kebenaran sampel yang digunakan dalam suatu penelitian. Determinasi dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu yang berada di Pesanggrahan, Kota Batu, Jawa Timur dengan mencocokkan karakteristik dan morfologi tanaman salak pondoh yang akan diteliti.

2. Pengambilan Sampel Biji Salak Pondoh

Sampel biji salak pondoh diperoleh dari tanaman salak pondoh yang tumbuh di desa Tirtomoyo, kecamatan Ampel Gading, Malang Jawa Timur. Biji tanaman dipilih dari buah yang sudah matang siap panen dalam keadaan segar dan bagus.

3. Pembuatan Simplisia Biji Salak Pondoh

Buah salak pondoh segar dipisahkan dagingnya dari biji dan kulit kemudian timbang biji. Dicuci bersih dari pengotor dan tiriskan, biji dipotong menjadi 4 bagian menggunakan pisau, lalu dikeringkan dengan sinar matahari selama 3 hari dan diperoleh simplisia, simplisia biji salak yang telah dikeringkan selanjutnya diserbuk menggunakan mesin penggiling kopi, kemudian diayak ayakan nomor 40 sehingga diperoleh serbuk yang homogen simplisia disimpan dalam wadah tertutup rapat. Biji salak yang sudah mengalami proses pengeringan ditandai dengan

tekstur yang menjadi lebih keras dibandingkan kondisi sebelumnya (Fujiko *et al.*, 2023).

4. Pembuatan Ekstrak Biji Salak Pondoh

Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Masukkan 900 gram serbuk kering simplisia ke dalam maserator, tambahkan 9 L bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama dengan pengadukan sesekali, kemudian biarkan selama 18 jam tanpa diaduk. Pisahkan larutan maserat dengan metode sentrifugasi. Proses ekstraksi ini diulang minimal satu kali menggunakan pelarut yang sama dengan volume setengah dari pelarut awal 4,5 L. Gabungkan semua masera diperoleh 10,5 L, kemudian lakukan penguapan menggunakan *vaccum rotary evaporator*. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya disimpan dalam wadah kaca yang tertutup rapat.

5. Penetapan Presentase Rendemen

Rendemen ekstrak dihitung sebagai persentase berat (b/b) dengan membandingkan berat rendemen terhadap berat serbuk simplisia yang digunakan berdasarkan hasil penimbangan. Nilai rendemen harus memenuhi batas minimum yang telah ditentukan dalam monografi masing-masing ekstrak (Kemenkes RI, 2017).

Rumus 1. Rendemen ekstrak biji salak

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\%$$

Keterangan :

Rendemen (%) : menunjukkan seberapa besar hasil ekstrak yang diperoleh dibandingkan dengan berat awal bahan yang digunakan.

Berat ekstrak kental : jumlah berat ekstrak yang dihasilkan setelah proses ekstraksi.

Berat simplisia : berat bahan kering (simplisia) mentah sebelum proses ekstraksi.

Pengeringan merupakan proses pengurangan massa bahan setelah dilakukan pengeringan sesuai dengan metode yang telah ditentukan.

6. Penetapan Susut Pengeringan.

Susut pengeringan adalah penurunan berat bahan setelah proses pengeringan sesuai prosedur yang telah ditentukan. Simplisia dipanaskan pada suhu 105°C, lalu sebanyak 2 gram simplisia ditimbang dengan teliti menggunakan botol timbang dangkal yang telah dipanaskan selama 30 menit dan ditara sebelumnya. Bahan diratakan dalam botol dengan menggoyangkan botol tersebut, kemudian botol dimasukkan ke dalam oven dengan tutup dibuka dan dikeringkan pada suhu yang telah ditetapkan selama 1 jam. Bahan ditimbang kembali hingga beratnya

konstan, selanjutnya bahan didinginkan dalam eksikator sampai mencapai suhu ruang. Berat dianggap sudah tetap apabila selisih antara dua kali penimbangan berturut-turut setelah pengeringan selama 1 jam tidak melebihi 0,25%, atau perbedaan berat tidak lebih dari 0,5 mg jika menggunakan timbangan analitik. Sebelum proses pengeringan, botol harus didinginkan dalam desikator dengan tutup tertutup hingga mencapai suhu ruang (Kemenkes RI, 2017).

Rumus 2. Susut Pengeringan

$$\frac{\text{bobot bahan awal sebelum dikeringkan} - \text{bobot bahan setelah dikeringkan}}{\text{bobot bahan sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

Keterangan :

Bobot bahan awal sebelum dikeringkan : berat kurs beserta sampel sebelum pengeringan.

Bobot bahan setelah dikeringkan : berat kurs beserta sampel sebelum pengeringan.

Bobot sebelum pengeringan : berat sampel awal sebelum pengeringan.

7. Penetapan Kadar Air

Siapkan toluen jenuh air dengan mencampurkan 200 mL toluen dan 10 mL air suling, lalu kocok hingga tercampur. Biarkan campuran tersebut mengendap dan pisahkan lapisan air yang terbentuk, kemudian buang lapisan air tersebut. Masukkan toluen jenuh air yang telah dipisahkan ke dalam labu dan pasang alat-alat yang diperlukan untuk pemanasan. Panaskan labu tersebut dan tunggu hingga tidak ada lagi tetesan air yang keluar, atau hingga volume air yang tersisa stabil, biasanya membutuhkan waktu sekitar 1 jam pemanasan. Setelah air dan toluen terpisah sempurna, catat volume air yang terbentuk. Kadar air kemudian dihitung dalam persentase volume terhadap berat (% v/b) (Kemenkes RI, 2017). Lakukan 3 kali replikasi, hitung rata-rata.

8. Identifikasi Ekstrak Kental Biji Salak Pondoh

Identifikasi ekstrak biji salak pondoh dilakukan secara organoleptik. Identifikasi organoleptik biji salak pondoh didapatkan berdasarkan bentuk, warna, bau dan rasa ekstrak kental biji salak.

9. Uji Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol untuk memastikan ekstrak yang dipakai tidak mengandung etanol setelah proses pemekatan. Uji bebas etanol dilakukan dengan menimbang $\pm 0,5$ gram ekstrak ditambahkan dengan 1 ml asam asetat dan 1 ml asam sulfat pekat pada tabung reaksi tutup tabung dengan kapas kemudian dipanaskan diatas *waterbath*, hasil menunjukkan bebas etanol jika tidak tercium bau ester.

10. Identifikasi Kandungan Senyawa Ekstrak Biji Salak Pondoh

10.1 Flavonoid. Timbang 500 mg serbuk, kemudian panaskan dengan 5 mL air dan saring hasilnya. Masukkan filtrat ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, 1 mL asam klorida pekat, dan 2 mL amil alkohol. Kocok campuran tersebut dan biarkan mengendap hingga terpisah. Hasil positif untuk flavonoid ditandai dengan munculnya warna jingga hingga merah yang menunjukkan keberadaan flavon, warna merah hingga jingga menandakan flavanol, dan warna jingga sampai merah keunguan menunjukkan adanya flavanon (Maryam *et al.*, 2020).

10.2 Tanin. Timbang 500 mg serbuk masukkan ke dalam tabung reaksi tambahkan 1-2 tetes larutan pereaksi FeCl_3 . Amati perubahan warna yang terjadi setelah penetesan pereaksi tersebut. Positif tanin jika terjadi perubahan warna biru kehitaman yang berarti mengandung tanin piragolol atau warna hijau, hijau kehitaman dan endapan yang berarti mengandung tanin katekol (Maryam *et al.*, 2020).

10.3 Alkaloid. Timbang 500 mg serbuk simplisia, kemudian tambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL *aquadest*. Panaskan campuran tersebut di atas penangas air selama 2 menit, lalu dinginkan dan saring. Bagilah filtrat ke dalam tiga tabung reaksi, kemudian lakukan pengujian menggunakan tiga jenis pereaksi yang berbeda:

- a. Masukkan 5 mL filtrat ke tabung reaksi, lalu beri 2 tetes pereaksi Mayer akan muncul endapan berwarna putih atau kuning.
- b. Masukkan 5 mL filtrat ke tabung reaksi dan tambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, maka akan terbentuk endapan dengan warna coklat hingga kehitaman.
- c. Masukkan 5 mL filtrat ke tabung reaksi tambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, akan terbentuk endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan.

Alkaloid dinyatakan positif apabila terbentuk endapan atau kekeruhan pada minimal dua dari tiga pengujian yang dilakukan.

10.4 Saponin. Timbang 500 mg serbuk sampel, tambahkan 10 mL air panas, lalu saring. Masukkan filtrat ke dalam tabung reaksi dan kocok dengan kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang bertahan selama 10 menit, dan busa tersebut tidak menghilang setelah ditambahkan beberapa tetes HCl 2N, hal ini menandakan keberadaan saponin (Maryam *et al.*, 2020).

11. Uji Aktivitas Ekstrak Biji Salak Pondoh

Alat – alat yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Pengujian menggunakan difusi sumuran, menyiapkan kapas lidi steril yang telah dicelupkan ke dalam suspensi bakteri digoreskan searah pada media MHA tunggu selama 10 menit agar bakteri dapat beradaptasi. Konsentrasi ekstrak biji salak pondoh 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, kontrol positif dan kontrol negatif. Membuat lubang sumuran kemudian dimasukkan sampel ekstrak pada setiap lubang. Tutup rapat media dengan kertas, inkubasi selama 24 jam dan hitung zona hambat yang dihasilkan.

11.1 Pembuatan Media Uji MHA. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 4,56 gram dimasukkan ke dalam erlenmayer 100 mL dilarutkan dengan *aquadest* steril 120 mL, media ditutup dengan kertas dan dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituangkan ke dalam cawan petri yang steril setelah 15 menit dan dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Setelah media mengeras, cawan petri ditutup, dibungkus dengan kertas, dan disimpan dalam lemari pendingin.

11.2 Pembuatan Larutan Mc Farland 0,5. Larutan H_2SO_4 1% sebanyak 9,95 mL dicampur dengan 0,05 mL larutan $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,75% dalam sebuah erlenmeyer, kemudian dikocok hingga terbentuk kekeruhan. Kekeruhan yang dihasilkan ini digunakan sebagai standar untuk mengukur kekeruhan suspensi bakteri uji (Kosasi *et al.*, 2019).

11.3 Pembuatan Media Uji VJA. Sebanyak 0,612 gram *Vogel Johnson Agar* (VJA) ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 10 mL air suling steril. Erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, media dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah media mengeras, cawan petri dibungkus dengan kertas dan disimpan di dalam lemari pendingin.

11.4 Identifikasi bakteri berdasarkan koloni. Gunakan kapas lidi steril yang dicelupkan ke dalam suspensi *S. aureus*, lalu lakukan inokulasi dengan metode gores pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditambahkan 2 tetes kalium telurit 1%. Inkubasi media tersebut pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian amati dan identifikasi hasilnya setelah inkubasi selesai.

11.5 Identifikasi Bakteri Secara Pewarnaan Gram.

Pewarnaan Gram dilakukan untuk menentukan karakteristik Gram dan bentuk morfologi bakteri. Buat sediaan ulas di atas objek gelas dan lakukan fiksasi di atas bunsen, selanjutnya teteskan *crystal violet* dan biarkan selama 2 menit. Buang sisa pewarna dan bilas dengan air mengalir. Seluruh preparat ditetes dengan larutan lugol dan dibiarkan selama 30 detik. Bilas kembali dengan air mengalir setelah membuang larutan lugol. Lanjutkan dengan melunturkan preparat menggunakan air mengalir hingga semua pewarna hilang. Teteskan larutan safranin pada preparat dan biarkan selama 2 menit. Setelah itu, bilas dengan air mengalir dan keringkan. Amati preparat tersebut menggunakan mikroskop dengan lensa objektif 100x dan teknik imersi (Hayati *et al.*, 2019).

11.6 Identifikasi Secara Biokimia.

Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan koagulase. Uji katalase dilakukan dengan mencampurkan satu tetes hidrogen peroksida (H_2O_2) ke dalam satu ose kultur bakteri *S. aureus*. Reaksi positif ditandai dengan munculnya gelembung udara atau busa.

Uji koagulase dilakukan dengan mencampurkan 0,5 mL plasma dengan satu ose kultur bakteri, kemudian menginkubasi campuran tersebut pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gumpalan, sedangkan jika tidak terjadi penggumpalan, hasilnya dianggap negatif (Agustie dan Samsumaharto, 2013).

11.7 Peremajaan Bakteri *S. aureus*.

Peremajaan bakteri dilakukan dengan menggoreskan bakteri pada media agar plate, yaitu dengan menumbuhkan bakteri dalam tabung yang berisi media *Nutrient Agar* (NA), kemudian menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C (Janna dan Maryati, 2023). Media NA merupakan media yang sering dipakai dalam laboratorium, menggunakan agar sebagai zat pengental, dan biasanya dimanfaatkan untuk mengamati bentuk serta karakteristik morfologi koloni mikroorganisme (Rinihapsari *et al.*, 2023).

11.8 Pembuatan Suspensi Bakteri.

Pembuatan suspensi bakteri *S. aureus* dilakukan setelah proses peremajaan kultur. Sebanyak 1-2 ose bakteri steril diambil dan dilarutkan dalam 5 mL larutan infus NaCl. Kekeruhan suspensi bakteri tersebut kemudian dibandingkan dengan standar 0,5 *Mc Farland* yang setara dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL, sebelum digunakan sebagai bakteri uji.

11.9 Pengujian Antibakteri Ekstrak Biji Salak Pondoh.

Siapkan cawan petri dengan bagian bawah dibagi menjadi 6 daerah. Tiap daerah diberi label dengan tulisan P1 ekstrak 7,5%, P2 ekstrak 10%, P3 ekstrak 12,5%, P4 ekstrak 15%, k- dan k+. Tuang media MHA hangat, tunggu hingga memadat kemudian ambil kapas lidi steril celupkan pada suspensi bakteri oleskan pada media tersebut. Buat 6 lubang sumuran dengan *boorprop*, pada masing-masing lubang masukkan 50 µL berbagai konsentrasi ekstrak, kontrol positif dan kontrol negatif. Media yang telah diperlakukan kemudian ditempatkan di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Amati dan ukur diameter zona hambat, yaitu area jernih yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

12. Rancangan Formulasi Emulgel Ekstrak Biji Salak Pondoh

Formulasi dibuat dengan variasi konsentrasi HPMC pada setiap formula yang berbeda. Detail rancangan formula emulgel antibakteri dari ekstrak biji salak pondoh disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Formula Sediaan Emulgel Antibakteri Ekstrak Biji Salak Pondoh

| Nama bahan | Konsentrasi % | | | | Fungsi |
|--------------------|---------------|------|------|------|----------------------|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | |
| Ekstrak biji salak | 12,5 | 12,5 | 12,5 | - | Zat aktif |
| HPMC | 2 | 2,5 | 3 | 2,5 | <i>Gelling agent</i> |
| Paraffin cair | 7,5 | 7,5 | 7,5 | 7,5 | Pembawa minyak |
| Tween 80 | 1,08 | 1,08 | 1,08 | 1,08 | Emulgator |
| Span 80 | 0,42 | 0,42 | 0,42 | 0,42 | Emulgator |
| Propilenglikol | 5 | 5 | 5 | 5 | Peningkat penetrasi |
| Metil paraben | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | Pengawet |
| Propil paraben | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | Pengawet |
| Gliserin | 3 | 3 | 3 | 3 | Humeikan |
| <i>Aquadest ad</i> | 100 | 100 | 100 | 100 | Pelarut |

Keterangan :

Formula 1 : emulgel ekstrak biji salak dengan variasi HPMC 2%

Formula 2 : emulgel ekstrak biji salak dengan variasi HPMC 2,5%

Formula 3 : emulgel ekstrak biji salak dengan variasi HPMC 3%

Formula 4 : emulgel tanpa ekstrak biji salak dengan variasi HPMC 2,5%

13. Pembuatan Sediaan Emulgel Ekstrak Biji Salak Pondoh

Pembuatan emulgel dilakukan sesuai dengan konsentrasi yang tercantum dalam formula pada tabel 1. Setiap bahan dasar emulgel ditimbang secara terpisah terlebih dahulu. Proses pembuatan dimulai dengan pembuatan basis emulsi, di mana fase minyak dibuat dengan mencampurkan span 80 dan parafin cair pada suhu 70°C. Sementara itu, fase air disiapkan dengan mencampurkan tween 80 dan sebagian air suling pada suhu yang sama. Fase minyak kemudian ditambahkan ke

dalam fase air pada suhu 70°C sambil terus diaduk menggunakan pengaduk hingga terbentuk emulsi yang homogen. Untuk pembuatan gel, HPMC dilarutkan secara bertahap ke dalam air panas bersuhu 80°C, didiamkan selama 5 menit, kemudian diaduk atau digerus hingga terbentuk basis gel yang stabil. Metil paraben dan propil paraben dilarutkan dalam propilenglikol dan ditambahkan gliserin, lalu campurkan dalam basis gel. Emulsi dan gel yang sudah terbentuk dicampurkan secara perlahan sambil digerus hingga terbentuk massa emulgel. Tambahkan ekstrak biji salak pondoh dan sisa *aquadest* dalam masa emulgel gerus hingga homogen (Dewi *et al.*, 2018).

14. Pengujian Mutu Fisik Emulgel Ekstrak Biji Salak Pondoh

14.1 Uji Organoleptik. Pengujian fisik dilakukan dengan menggunakan pancha indera untuk mengevaluasi sifat-sifat emulgel ekstrak biji salak pondoh. Pemeriksaan meliputi penilaian warna, aroma, rasa, dan bentuk sediaan, yang dilakukan sebanyak tiga kali ulangan pada setiap formula (Wulandari *et al.*, 2023).

14.2 Uji Homogenitas. Sebanyak 0,1 gram sampel ditimbang dan ditempatkan pada gelas objek. Komponen emulgel yang mengandung ekstrak biji salak pondoh harus tersebar secara merata, tanpa adanya partikel kasar yang tampak, serta memiliki keseragaman yang baik. Pengujian ini dilakukan dengan tiga kali ulangan untuk setiap formula yang diuji (Depkes RI, 2015).

14.3 Uji Tipe Emulgel

14.3.1 Kelarutan Zat Warna. Kelarutan zat warna dilakukan dengan menggunakan uji kelarutan warna. Pewarnaan pada sediaan emulgel dengan menggunakan *metilen blue*, ulangi pengujian sebanyak 3 kali. Tipe minyak dalam air jika sediaan bercampur homogen dengan *metilen blue* dan jika tidak tercampur maka bertipe air dalam minyak (Bakri dan Sinala, 2023).

14.3.2 Pengenceran. Pengujian jenis emulgel dilakukan dengan metode pengenceran, yaitu dengan memasukkan sampel ke dalam vial lalu menambahkan 10 mL *aquadest*. Campuran tersebut dikocok atau diaduk menggunakan batang pengaduk. Proses ini diulang sebanyak tiga kali. Jika emulsi yang terbentuk homogen, maka emulsi tersebut termasuk tipe minyak dalam air (M/A). Sebaliknya, jika emulsi tidak homogen, maka tipe emulsi yang terbentuk adalah air dalam minyak (A/M) (Rusli, 2021).

14.3.3 Daya Hantar Listrik. Pengujian menggunakan alat *voltmeter*. Celupkan alat *voltmeter* ke dalam sampel, amati pergerakan jarum *voltmeter*. Tipe M/A jika jarum *voltmeter* bergerak, jika tidak bergerak maka tipe A/M.

14.4 Uji pH. Pengujian pH dilakukan menggunakan pH meter yang sudah dikalibrasi menggunakan *aquadest*. Bersihkan elektroda menggunakan tisu, siapkan sampel yang akan diuji klik pada tombol *read/enter*, tunggu hingga alat menampilkan pembacaan angka yang stabil dan catat hasil. Pengukuran pH pada sediaan emulgel dilakukan tiga kali untuk setiap formula yang diuji. Rentang pH yang dianggap normal untuk kulit berada di antara 4,5 hingga 6,5, sesuai dengan standar yang ditetapkan dalam SNI No. 06-2588 (Bakri dan Sinala, 2023).

14.5 Uji Daya Sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram emulgel, kemudian menempatkannya di tengah lempeng kaca bulat berskala berdiameter 15 cm. Setelah itu, emulgel ditutup dengan kaca lain dan diberikan beban awal sebesar 50 gram selama 1 menit. Beban kemudian ditambah secara bertahap menjadi 100 gram dan 150 gram. Hasil daya sebar antara 5 hingga 7 cm menunjukkan bahwa konsistensi semisolid tersebut nyaman untuk digunakan. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali untuk setiap formula untuk memastikan keakuratan hasil (Wulandari *et al.*, 2023).

14.6 Uji Daya Lekat. Sebanyak 1 gram emulgel ditaruh di atas kaca objek, lalu ditutup dengan kaca lain, selanjutnya beban seberat 500 gram diletakkan di atasnya dan dibiarkan selama 5 menit. Kaca objek diangkat sambil mencatat waktu yang dibutuhkan agar kedua kaca tersebut terpisah.

14.7 Uji Viskositas. Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan viskometer *Brookfield*. Pertama, tuangkan sampel ke dalam gelas kimia berkapasitas 100 mL. Nyalakan alat dengan menekan tombol *power* yang terletak di bagian belakang, lalu tunggu hingga proses *autozero* selesai. Pasang spindel nomor 6 dan atur posisi spindel agar tercelup ke dalam sampel hingga mencapai tanda batas yang terdapat pada spindel. Setel kecepatan putaran pada 100 rpm. Lakukan pengukuran viskositas, dan jika perlu, gunakan panel termometer untuk mengontrol suhu. Pastikan torsi yang ditunjukkan oleh alat berada dalam rentang 10-90%. Pengujian ini diulang sebanyak tiga kali untuk setiap sampel guna mendapatkan hasil yang konsisten.

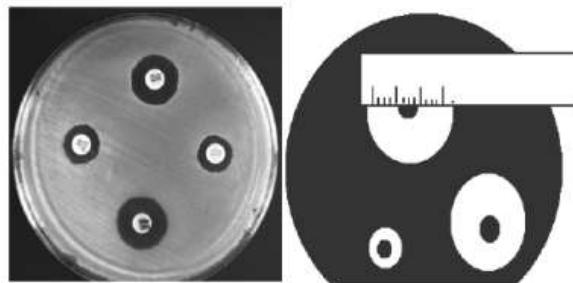
14.8 Uji Stabilitas Dipercepat

Pengujian stabilitas secara dipercepat dilakukan menggunakan metode *cycling test*. Pada metode ini, sampel emulgel disimpan terlebih dahulu pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke oven dengan suhu 40°C selama 24 jam pada hari berikutnya, yang membentuk satu siklus. Proses ini diulang sebanyak 6 siklus selama total 12 hari, setelah itu dilakukan pengamatan ulang terhadap sifat organoleptik, pH, dan viskositas sediaan. Setiap pengujian dilakukan dengan tiga kali pengulangan untuk memastikan konsistensi hasil (Wulandari *et al.*, 2023).

15. Uji Aktivitas Antibakteri Emulgel Ekstrak Biji Salak Pondoh

15.1 Uji Aktivitas Antibakteri. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode sumuran pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kapas lidi steril kultur bakteri yang sudah sesuai dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 digores dalam media MHA. Buat lubang sebanyak 5 lubang menggunakan *boorprop* pada agar yang telah tercampur bakteri uji, beri garis pada bagian belakang cawan petri menggunakan spidol untuk membagi media menjadi 5 bagian. Setiap sumuran diisi dengan 50 µL dari masing-masing sampel: kontrol negatif, kontrol positif (*Clindamycin phosphate* 1%), formula 1, formula 2, dan formula 3. Sampel kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, setelah inkubasi diameter zona hambat atau area bening di sekitar sumuran diukur menggunakan penggaris dalam satuan milimeter. Zona bening ini menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri dan menunjukkan efek antibakteri yang positif. (Janna dan Maryati, 2023).

15.2 Perhitungan Daya Hambat Bakteri. Proses inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian zona hambat yang merupakan area bening di sekitar sumur tanpa adanya pertumbuhan koloni bakteri diukur. Diameter zona bening pada media agar difusi diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter untuk menilai efektivitas ekstrak biji salak pondoh (*Sallaca zalacca* (Gaertn.) Voss) terhadap pertumbuhan *S. aureus*. Menurut klasifikasi Davis dan Stout (1971), kekuatan hambatan bakteri dibagi menjadi sangat kuat jika zona bening lebih dari 20 mm, kuat pada rentang 10 sampai 20 mm, sedang antara 5 hingga 10 mm, dan lemah jika kurang dari 5 mm. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan penggaris, mengacu pada ukuran area bening yang mengelilingi sumur uji, yang dikenal sebagai diameter penghambatan.



Gambar 12. Pengukuran diameter zona hambat (Suryani *et al.*, 2015).

Rumus 3. Zona hambat

$$\text{Zona hambat (zona bening)} = \frac{\text{diameter 1} + \text{diameter 2} + \text{diameter 3}}{3}$$

Keterangan :

Diameter 1 : diameter zona hambat secara vertikal.

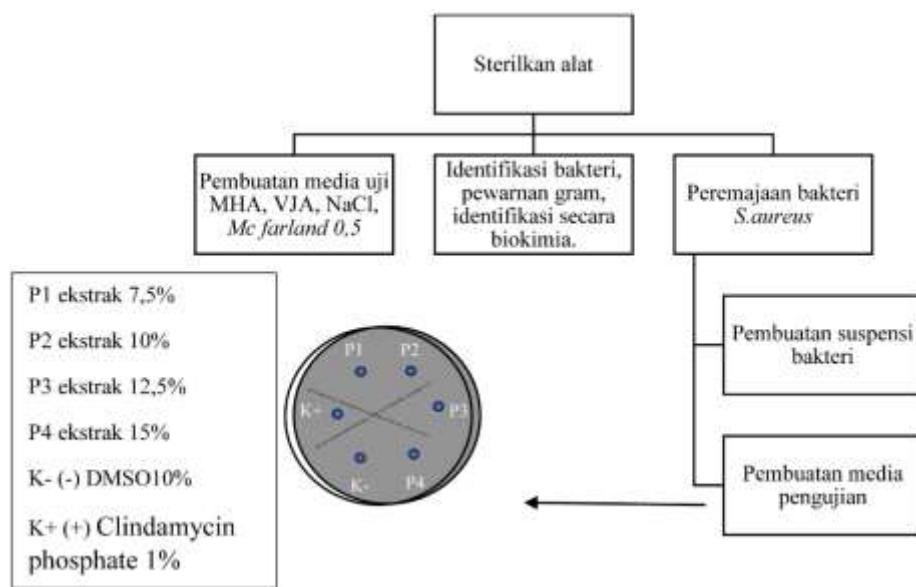
Diameter 2 : diameter zona hambat secara horizontal.

Diameter 3 : diameter zona hambat secara diagonal.

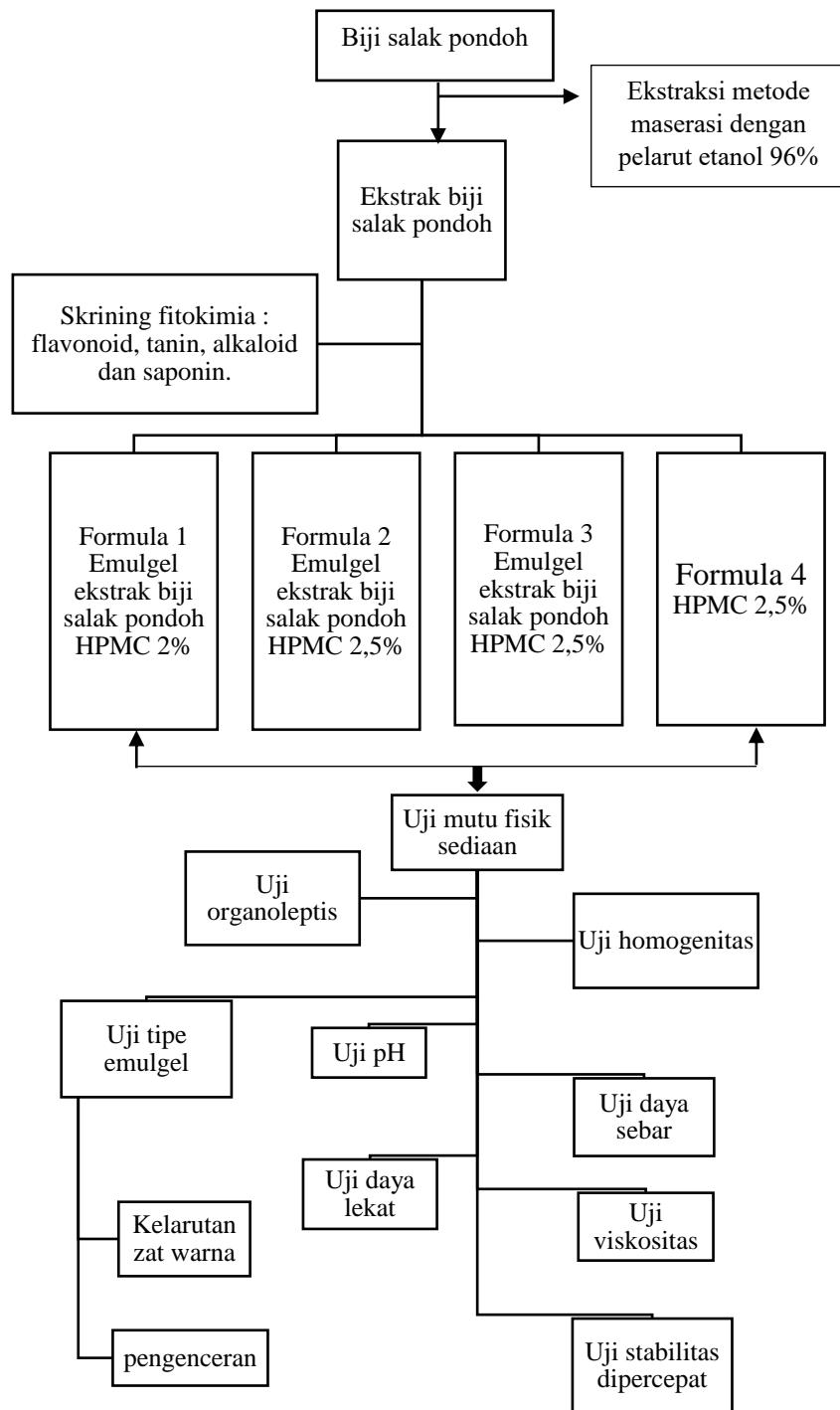
E. Analisis Hasil

Pada penelitian ini dilakukan analisis data hasil pengujian dianalisis secara statistik menggunakan SPSS dengan *Shapiro wilk* data terdistribusi normal nilai ($p>0,05$) dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA (Analisis of Variant)* dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan pada setiap uji sifat fisik emulgel pada keempat formula. Data terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* jika data homogen atau *Dunnett's* jika data tidak homogen. Uji *Tukey* untuk mengetahui pengaruh sama atau berbeda tiap konsentrasi. Hasil ketika nilai p tidak terdistribusi normal, nilai ($p<0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal -Wallis* dan diikuti dengan uji *Mann-Whitney* yang bertujuan untuk menentukan konsentrasi mana yang memiliki pengaruh yang sama atau berbeda antara satu dengan yang lain. Uji stabilitas menggunakan statistik *Paired T-Test* untuk mengetahui ada perbedaan signifikan atau tidak antara parameter produk sebelum dan sesudah uji stabilitas.

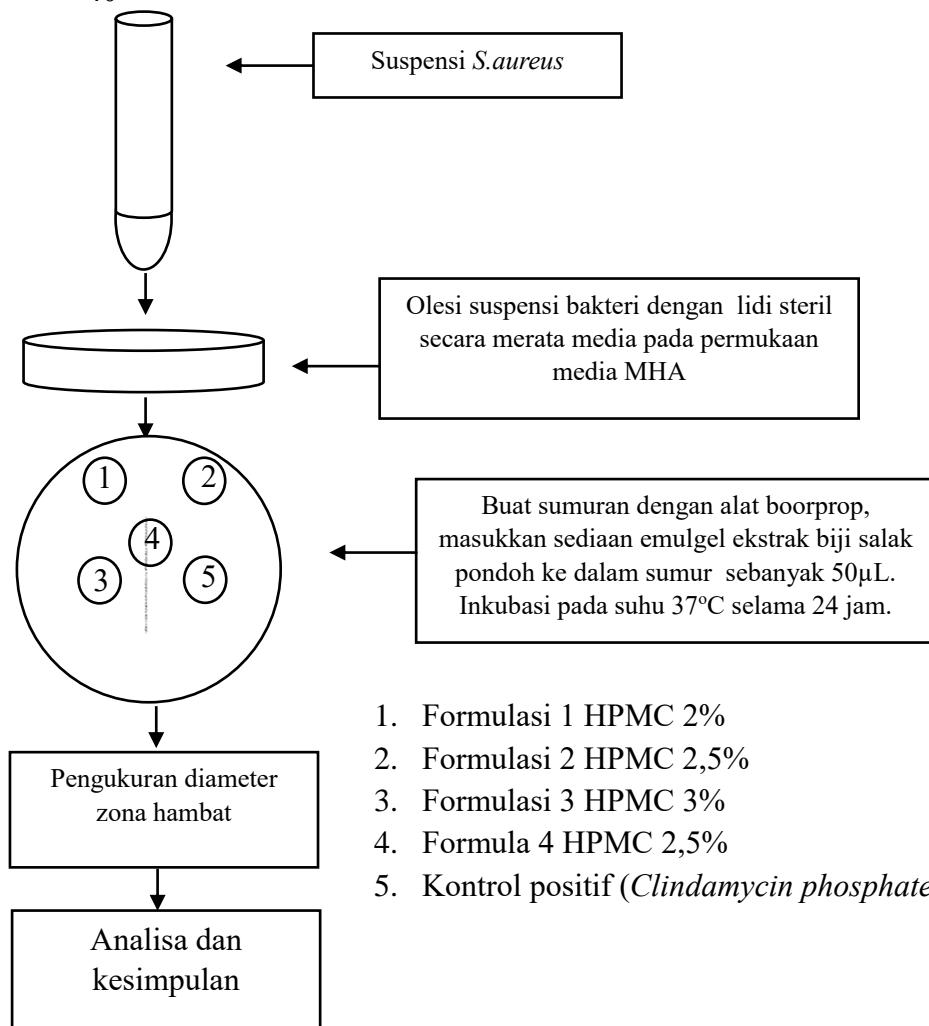
F. Skema Penelitian



Gambar 13. Pengujian Ekstrak Biji Salak Pondoh Terhadap Bakteri Metode Difusi Sumuran



Gambar 14. Formulasi Emulgel dan Uji Mutu Fisik Emulgel Ekstrak Biji Salak Pondoh



Gambar 15. Analisa Diameter Zona Hambat Formula Ekstrak Biji Salak Pondoh Dengan Metode Sumuran Terhadap Bakteri *S. aureus*