

BAB 3

MEDOTE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai bulan April 2025.

Tempat penelitian dilakukan di Labolatorium mikrobiologi Prodi S1 Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain yakni neraca analitik (Ohaus), mortir stamfer, alat-alat gelas (Pyrex) dehydrator, blender (Miyako), bejana kaca besar, sendok pengaduk, waterbath (Thermostat water bath HH-60), autoklaf (Allamerican 25X-2), oven (Gentra), petri dish, pinset, pelubang (cork borer), pipet tetes, mikro pipet, kapas, jarum ose, lampu spirtus, inkubator (Memmer), jangka sorong.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain yakni Bawang putih (*Allium sativum* L.), Apel manalagi (*Malus sylvestris* (L) Mill.), carbopol 940, metil paraben, propylen glikol, trietanolamine, etanol 96%, media NA, NaCl 0,9%, HCl pekat, HCl 1N, H₂SO₄ pekat, FeCl 5 %, magnesium, pereaksi mayer, wagner, dragendroff dan klindamisin.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental labolatorium untuk mengetahui aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak bawang putih dan

sari apel manalagi dalam sediaan spot gel sebagai anti jerawat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Variabel yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi konsentrasi ekstrak bawang putih dan sari apel manalagi dalam sediaan spot gel.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu efektivitas bawang putih dan apel manalagi pada bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu pembiakan bakteri *Propionibacterium acnes*, serta kontrol positif menggunakan klindamisin dan kontrol negatif menggunakan basis gel carbopol.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan bukti identitas tanaman yang digunakan untuk menghindari kesalahan pengambilan bahan. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Farmasi Prodi S1 Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu bawang putih (*Allium sativum* L.) dan buah apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill) yang diperoleh dari Desa Tuwel, Kecamatan Bojong, Kabupaten Tegal. Bawang putih yang diambil sebanyak 5 kg dan apel manalagi sebanyak 1 kg.

3.4.3 Pengolahan Sampel

a. Bawang putih

Sebanyak 5 kg umbi bawang putih segar dan tidak busuk dicuci dengan air mengalir dan tiriskan hingga tidak ada air yang menetes dan dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran dan bahan asing, kemudian diiris tipis-tipis dan dikeringkan dengan cara dijemur selama $\pm$ 5 hari dan dioven pada suhu 60°C. Setelah kering, diblender sampai halus hingga diperoleh serbuk simplisia bawang putih (Dewi, 2020).

b. Apel manalagi

Buah apel yang segar dicuci sampai bersih dengan air mengalir dan tiriskan hingga tidak ada air yang menetes dan dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran dan bahan asing, kemudian dipotong menjadi beberapa bagian, selanjutnya dihaluskan menggunakan blender dengan perbandingan 2:1 atau 1000 g buah apel dengan 500 mL air. Lalu hasil yang didapat disaring menggunakan kain saring (Khairina, Dwiloka, & Susanti, 2018).

3.4.4 Pembuatan Ekstrak Metode Maserasi Bawang Putih

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 300 g serbuk simplisia bawang putih dengan pelarut perbandingan 1:7 dengan pelarut sebanyak 2100 mL etanol 96% untuk satu kali penyarian dalam wadah kaca dan disimpan di suhu kamar selama 4 x 24 jam sambil diaduk sesekali selama 4 hari. Selanjutnya dilakukan penyaringan fitrat yang dihasilkan diuapkan dengan waterbath sehingga diperoleh ekstrak kental (Atmaja, Fajaryanti, Mediastini, 2022).

Rendemen merupakan hasil bagi dari berat produk (ekstrak) yang dihasilkan (Chairunnisa, Wartini, & Suhendra L, 2019). Kemudian dilakukan perhitungan rendemen ekstrak bawang putih dengan rumus perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak kental bawang putih (g)}}{\text{Berat bubuk bawang putih (g)}} \times 100\%$$

3.4.5 Standardisasi Ekstrak Bawang Putih

1) Uji Organoleptik

Parameter organoleptik dilakukan untuk mengevaluasi mutu sediaan dengan menilai penampilan visual produk terhadap bentuk, warna, bau, dan dengan menggunakan pancaindera (Andasari, Mustofa, & Arabela, 2021).

2) Uji Susut Pengerinan

Timbang 1 g ekstrak dalam cawan yang telah dipanaskan selama 30 menit pada suhu 105°C. Dengan menggoyangkan, buat lapisan tebal (5 mm–10 mm) dan keringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap. Buka tutupnya dan biarkan cawan tertutup dan mendinginkan dalam desikator hingga suhu kamar. Kemudian catat bobot tetap (Andasari *et al.*, 2021). Berdasarkan persyaratan yang relevan susut pengerinan tidak diperbolehkan melebihi dari 11% (Kepel dan Bodhi, 2020).

$$\% \text{ Susut Pengerinan} = \frac{\text{Bobot 1}-\text{Bobot 2}}{\text{Bobot 1}} \times 100\%$$

Keterangan:

Bobot 1 = berat ekstrak sebelum pengerinan

Bobot 2 = berat ekstrak setelah pengerinan

3) Uji Kadar Air

Timbang 1 g ekstrak dan diletakkan pada cawan *moisture analyzer*. Setelah itu, diatur suhu *moisture analyzer* pada 105°C lalu ditutup bagian penutup *moisture analyzer* dan ditunggu hingga diketahui kadar air kemudian dicatat hasilnya (Ngurah dan Dewantara, 2023). Berdasarkan persyaratan yang relevan kadar air tidak diperbolehkan melebihi dari 10% (Kepel dan Bodhi, 2020).

4) Uji Kadar Abu

Timbang 1 g ekstrak dimasukkan dalam krus yang telah dipanaskan dalam oven dengan suhu 600°C selama 30 menit, kemudian didinginkan selama 15 menit dan ditimbang. Sampel dimasukan kedalam tanur dengan suhu 600°C selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan dengan suhu dan ditimbang hingga bobot konstan. Penetapan kadar abu dilakukan untuk mengetahui jumlah bahan anorganik atau mineral yang tersisa setelah proses pengabuan (R dan Forst, 2020). Menurut parameter standar yang berlaku, nilai kadar abu tidak lebih dari 16,6% (Kepel dan Bodhi, 2020).

$$\text{Kadar abu} = \frac{(\text{Berat krus+abu}-\text{berat krus kosong})}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100$$

5) Uji Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut asam dipisahkan dengan cara disaring menggunakan kertas saring bebas abu dan residunya dibilas dengan air panas. Abu

yang tersaring dan kertas saringnya dimasukkan kembali dalam krus yang sama. Setelah itu ekstrak dipijarkan dengan menggunakan tanur secara perlahan-lahan (dengan suhu dinaikkan secara bertahap hingga 600°C) hingga arang habis. Kemudian ditimbang hingga bobot tetap (W3) (R & Forst, 2020).

3.4.6 Uji Skrining Fitokimia Bawang Putih Dan Sari Apel Manalagi

1) Uji Alkaloid

Ditimbang 0,5 g ekstrak dan sari ditambahkan beberapa tetes HCL 2N, setelah larut kemudian ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer, wagner dan dragendrof. Reaksi positif menunjukkan adanya endapan (Cahyaningsih dan Sandhi, 2019).

2) Uji Flavonoid

Ditimbang 0,5 g ekstrak dan sari ditambahkan 100 mL air panas, lalu dididihkan selama 5 menit, selanjutnya disaring. Filtrat diukur 5 mL kemudian ditambah 0,05 mg serbuk Magnesium dan 1 mL HCl pekat, dikocok kuat. Hasil positif menunjukkan adanya perubahan larutan menjadi warna merah, kuning atau jingga (Cahyaningsih dan Sandhi, 2019).

3) Uji Tannin

Ditimbang 0,5 g ekstrak dan sari di larutkan dengan 5 mL air, ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 5%. Reaksi positif ditunjukkan adanya warna biru tua atau hitam kehijauan (Cahyaningsih dan Sandhi, 2019).

4) Uji Saponin

Ditimbang 0,5 g ekstrak dan sari ditambahkan dengan 10 mL air, dikocok selama 1 menit jika terdapat busa maka menunjukkan hasil positif mengandung saponin (Cahyaningsih dan Sandhi, 2019).

3.4.7 Formulasi

Tabel 3. 1 Formulasi Sediaan Spot Gel Jerawat

Bahan	Fungsi bahan	Jumlah (%)				Range	Literatur
		F0	F1	F2	F3		
Ekstrak bawang putih	Zat aktif	-	10	15	20	-	-
Sari apel manalagi	Zat aktif	-	20	15	10	-	-
Carbopol 940	<i>Gelling agent</i>	2	2	2	2	0,5–2%	(Rowe <i>et al.</i> , 2009)
Propilen glikol	Penstabil	12	12	12	12	10–15%	(Rowe <i>et al.</i> , 2009)
TEA	<i>Alkalizing agent</i>	2	2	2	2	2 – 4%	(Rowe <i>et al.</i> , 2009)
Metil paraben	Pengawet	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4%	(Rowe <i>et al.</i> , 2009)
Aquadest	Pelarut	Add 100	Add 100	Add 100	Add 100		

3.4.8 Pembuatan Spot Gel

Pembuatan sediaan gel dilakukan dengan menimbang bahan yang digunakan yaitu Carbopol, Metil paraben, Propilen glikol, TEA dan disiapkan aquades. Gel dibuat dengan cara dikembangkan basis gel carbopol dengan menggunakan aquades hangat dalam mortir lalu dicampurkan TEA ke dalam basis yang sudah dikembangkan lalu dihomogenkan. Kemudian, larutkan metil paraben dengan propilen glikol, dan dimasukkan ke dalam mortir, aduk ad homogen. Selanjutnya,

masukan ekstrak bawang putih ke dalam basis gel dan aduk ad homogen. Setelah itu ditambahkan dengan sari apel manalagi.

3.4.9 Evaluasi Fisik Sediaan

1. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptik dilakukan dengan cara melakukan pengamatan secara visual terhadap kesesuaian bentuk, warna, aroma dan rasa sensasi saat diaplikasikan pada kulit (Irianto, Purwanto, & Mardan, 2020).

2. Uji Homogenitas

Sediaan gel dioleskan pada kaca transparan. Jika tidak ada butiran kasar maka sediaan dinyatakan homogen (Irianto *et al.*, 2020).

3. Uji pH

Uji pH sediaan gel diukur menggunakan stik pH universal dengan cara dicelupkan ke dalam sampel gel. Nilai pH sediaan yang memenuhi kriteria pH kulit dan tidak mengiritasi yaitu pH 4,5-6,5 (Irianto *et al.*, 2020).

4. Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan meletakkan 0,5 g gel di atas kaca obyek kemudian ditutup dengan kaca obyek lainnya, dan diberi beban 1 kg selama 3 menit. Penentuan daya lekat berupa waktu yang diperlukan sampai kedua kaca obyek terlepas. Syarat daya lekat yaitu lebih dari 1 detik (Irianto *et al.*, 2020).

5. Uji Daya Sebar

Sebanyak 0,5 g gel diletakkan pada bagian tengah kaca bulat berskala, kemudian ditutup dengan kaca bulat lain. Pengukuran diameter penyebaran sediaan secara membujur dan melintang, serta dilakukan tiap penambahan beban 50 g hingga berat total 150 g. Daya sebar yang memenuhi syarat yaitu 5-7 cm (Irianto *et al.*, 2020).

6. Uji Viskositas

Pengukuran viskositas sediaan gel dilakukan dengan menggunakan viskometer, dilakukan dengan cara mencelupkan spindle ke dalam sediaan gel kemudian diamati dan dihitung viskositasnya. Viskositas gel yang baik sebesar 2000 – 4000 (Thomas *et al.*, 2019).

3.4.10 Uji Aktivitas Antibakteri

1. Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan dicuci hingga bersih dengan aquadest, kemudian dibungkus dengan kertas dan disterilkan selama 2 jam dalam oven bersuhu 180°C. Alat berskala dan tidak tahan panas disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, dan ose dipijarkan pada Bunsen (Angraini *et al.*, 2024).

2. Pembuatan Media NA (Nutrien Agar)

Ditimbang 3,8 g serbuk NA, kemudian dimasukkan ke Erlenmeyer, dilarutkan aquadest hingga 100 mL. Setelah itu dididihkan hingga larut sempurna kemudian ditutup dengan kapas

dan dimasukkan kedalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Selanjutnya media didinginkan (Angraini *et al.*, 2024).

3. Peremajaan Bakteri

Bakteri *Propionibacterium acnes* diambil dengan menggunakan ose steril dari kultur murninya. Lalu ose digoreskan pada media agar miring dan disimpan dalam inkubator selama satu hari pada suhu 35°C. Ini merupakan proses mengaktifkan kembali kultur bakteri yang telah disimpan, sehingga bakteri tersebut siap untuk digunakan (Angraini *et al.*, 2024).

4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil 1 ose bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah diremajakan, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9% (Angraini *et al.*, 2024).

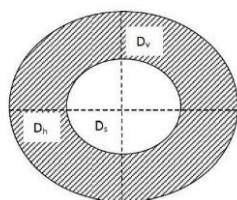
5. Uji Aktivitas Bakteri

Untuk melakukan uji ini, digunakan metode difusi sumuran. Metode difusi sumuran merupakan salah satu metode uji aktivitas antibakteri dimana larutan uji dimasukan ke dalam sumur pada media agar yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme. Zat aktif akan terdifusi dari sumur ke agar, membentuk zona hambat disekelilingnya jika memiliki efek antibakteri. Metode ini merupakan metode paling umum dan sesuai untuk bentuk sediaan semisolid seperti gel. Keunggulan metode sumuran dapat digunakan untuk sediaan cair atau ekstrak kasar. Langkah pertama 10 mL media NA (Nutrien Agar) cair steril dimasukkan ke dalam

cawan petri dan dihomogenkan hingga memadat. Kemudian, ditambahkan suspensi bakteri yang telah dibuat dan ditambahkan lagi 7 mL NA sebagai lapisan kedua. Dibuat empat lubang dan diberi jarak sesuai pola yang dibuat untuk masing-masing konsentrasi, dan kemudian pelubang diangkat. Sehingga terbentuk sumur-sumur yang akan digunakan dalam uji bakteri. Selanjutnya pembuatan larutan uji dengan mengambil gel kombinasi ekstrak bawang putih dan sari apel merah masing-masing F0, F1, F2, F3, kontrol positif (klindamisin 1%) sebanyak 2 g dan masing-masing dilarutkan dengan 2 mL aquades. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri yaitu dilakukan dengan mengambil larutan uji sebanyak 50 μ L dan dipipet pada masing-masing larutan sumuran. Lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 35°C selama 24 jam. Kemudian diukur zona hambat secara horizontal vertikal dan diagonal (Azhari, Mayasari, and Rusli, 2021).

Zona hambat atau juga dikenal sebagai zona bening disekitar kertas cakram menunjukkan kepekaan bakteri terhadap zat antibakteri yang diuji. Zona hambat ini diukur dengan jangka sorong dengan ukuran vertikal dan horizontal dalam mm (Magvirah, Marwati, & Ardhani, 2020). Aktivitas zona hambat antimikroba dikelompokkan menjadi empat kategori, yaitu: aktivitas lemah (<5 mm), sedang (5- 10 mm), kuat (>10- 20 mm), sangat kuat (>20- 30 mm). Aktivitas daya hambat antimikroba

dinyatakan berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekitar sumuran. Semakin kuat efek antibakteri, maka semakin luas zona hambat yang terbentuk. Faktor yang dapat mempengaruhi zona hambat yaitu konsentrasi bahan aktif antibakteri, jenis mikroorganisme uji (g positif atau negatif), pH dan ketebalan media agar, lama inkubasi dan suhu inkubasi. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri diukur dalam satuan mm (Herrmann & Bucksch, 2019). Diameter zona hambat diukur dengan rumus:



$$\frac{(D_v - D_s) + (D_h - D_s)}{2}$$

Keterangan:

Dv : diameter vertikal

Dh : diameter horizontal

Ds : diameter sumuran

3.5 Analisis Data

Penelitian hasil uji aktivitas antibakteri pada sediaan spot gel dilakukan analisis data menggunakan *Statistical Product and Service Solutio* (SPSS) versi 22 uji *Kruskal wallis* untuk mengetahui perbandingan antar formula.