

BAB IV

PROSEDUR

4.1. Pengumpulan Minyak Bunga Cengkeh

Minyak bunga cengkeh diperoleh dari Badan Penelitian Tanaman Obat dan Rempah, Bogor.

4.2. Karakterisasi Organoleptik, pH dan Mutu Minyak Bunga Cengkeh

Karakterisasi organoleptik dilakukan dengan melakukan pengamatan minyak bunga cengkeh secara organoleptis lewat bentuk, bau, dan warna. Untuk karakterisasi pH dilakukan pengukuran pH minyak bunga cengkeh menggunakan pH meter, sedangkan karakterisasi mutu minyak bunga cengkeh yang meliputi, berat jenis, putaran optik, indeks bias, kadar eugenol, minyak lemak, dan kelarutan dalam etanol 70% sesuai dengan SNI dilakukan oleh Badan Penelitian Tanaman Obat dan Rempah, Bogor.

4.3. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Minyak Bunga Cengkeh terhadap Bakteri *P. acnes*

Persiapan dalam penentuan konsentrasi hambat minimum meliputi, pembiakan dan pembuatan suspensi bakteri *P. acnes*, pembuatan media uji nutrisi agar, serta optimasi penentuan KHM minyak bunga cengkeh.

4.3.1. Pemiakan Bakteri *P. acnes*

Bakteri *P. acnes* dipelihara dalam media agar miring dan disimpan dalam lemari pendingin. Pengembangbiakan kembali dilakukan dalam agar miring menggunakan media nutrient agar dengan cara menggoreskan 1 ose bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam maka dapat dilihat goresan putih pada agar miring yang menunjukkan bakteri tersebut tumbuh.

4.3.2. Suspensi Bakteri *P. acnes*

Bakteri *P. acnes* dari hasil biakan selanjutnya dibuat suspensi bakteri dengan cara mensuspensikan bakteri sebanyak 1 ose ke dalam nutrien broth yang sebelumnya telah disterilisasi. Suspensi kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebelum digunakan diukur nilai transmitannya hingga mencapai 25% pada panjang gelombang 530 nm.

4.3.3. Pembuatan Media Uji Nutrien Agar

Pembuatan media uji ini dengan melarutkan media *nutrient agar* (NA) kedalam aquadest dengan takaran sebanyak 20 gram per liter. Selanjutnya media disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

4.3.4. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Bunga Cengkeh

Uji aktivitas antibakteri minyak bunga cengkeh ini menggunakan metode difusi agar dengan konsentrasi 0,1; 0,25; 0,5; 1; dan 2% dengan menggunakan pelarut DMSO. Sebanyak 20 mL media nutrient agar (NA) yang sudah steril diinokulasi dengan suspensi bakteri *P. acnes* sebanyak 100 µL dipipet dengan pipet mikro lalu dimasukkan kedalam cawan petri steril kemudian cawan petri digoyang hingga bakteri dan media homogen dan biarkan memadat. Langkah

selanjutnya adalah media agar dilubangi dengan alat khusus (*perforator*), sehingga terbentuk lubang berdiameter 0,6 cm. Sampel minyak bunga cengkeh yang sudah diencerkan dimasukkan ke dalam masing-masing lubang dan diberi kode sesuai dengan konsentrasi minyak bunga cengkeh yang dimasukkan, lalu diinkubasi selama 18-24 jam. Dilakukan juga pengujian terhadap pelarut minyak bunga cengkeh sebagai blangko dan klindamisin sebagai kontrol positif. Dalam uji ini hasil positif ditandai dengan terbentuknya daerah bening pada daerah lubang. Diameter zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri. Nilai KHM tersebut akan menjadi dasar penentuan konsentrasi minyak bunga cengkeh untuk sediaan emulgel dan mikroemulsi yang akan dibuat.

4.4. Pembuatan Emulgel

Basis emulsi dibuat dengan cara memanaskan masing-masing fase minyak (parafin cair-minyak bunga cengkeh-GMS atau parafin cair-minyak bunga cengkeh-setosterail alkohol) dan fase air (aquadest-TEA atau aquadest-Natrium lauril sulfat) di atas tangas air sampai suhu 60-70°C. Setelah masing-masing fase telah mencapai suhu $\pm 65^{\circ}\text{C}$, kemudian kedua fase dicampur dan diaduk menggunakan alat pengaduk *Ultra turrax* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit hingga homogen. Campuran lalu ditambahkan tokoferol, metil paraben dan propil paraben yang telah dilarutkan dalam propilenglikol, kemudian diaduk lagi menggunakan alat pengaduk *Ultra turrax* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit hingga homogen. Lalu ditambahkan karbomer yang telah

dikembangkan dengan aquadest dan diaduk kembali dengan alat pengaduk mekanik dengan kecepatan 500 rpm hingga homogen.

4.5. Pembuatan Mikroemulsi

Mikroemulsi dibuat dengan terlebih dahulu mencampurkan fase minyak minyak bunga cengkeh, surfaktan tween 80, dan kosurfaktan gliserin-propilen glikol hingga suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ dan kemudian dicampurkan dengan fase air (aquadest) yang sudah dipanaskan dan diaduk menggunakan pengaduk mekanik pada kecepatan 150 rpm selama 5 menit. Campuran lalu ditambahkan tokoferol, metil paraben dan propil paraben yang telah dilarutkan dalam propilenglikol, kemudian diaduk kembali menggunakan alat pengaduk mekanik dengan kecepatan 150 rpm selama 5 menit hingga homogen.

4.6. Evaluasi Sediaan Emulgel dan Mikroemulsi

Evaluasi sediaan emulgel dan mikroemulsi yang dilakukan adalah evaluasi pengujian organoleptik, homogenitas, penentuan tipe emulsi, viskositas, pH, sentrifugasi, *freeze-thaw*, dan stabilitas dipercepat.

4.6.1. Evaluasi organoleptik

Evaluasi meliputi pengamatan terhadap perubahan warna, bau dan konsistensi dari emulgel dan mikroemulsi yang baru dibuat dan pengamatan dilakukan pada hari ke 1, 7, 14, 21, dan 28 hari pada sediaan yang disimpan pada suhu kamar.

4.6.2. Evaluasi homogenitas

Sampel sediaan emulgel dan mikroemulsi diletakkan diatas kaca objek lalu ditekan dengan kaca objek lain hingga rata, dan diamati homogenitasnya secara visual.

4.6.3. Evaluasi penentuan tipe emulsi

Penentuan tipe emulsi dilakukan dengan uji pengenceran. Dilakukan dengan mengencerkan emulgel dan mikroemulsi menggunakan air. Jika emulsi tercampur baik dengan air, tanpa memperlihatkan ketidakcampuran maka tipe emulsi adalah minyak dalam air. Hal ini dapat dilakukan dengan mikroskop untuk memberikan visualisasi yang lebih baik.

4.6.4. Evaluasi pengukuran viskositas

Penentuan viskositas sediaan emulgel dan mikroemulsi dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield RVT dengan spindle no.15. Pengukuran dilakukan di hari ke 1, 7, 14, 21, dan 28 hari pada suhu kamar.

4.6.5. Evaluasi pengukuran pH

Pengukuran menggunakan pH meter pada sediaan di hari ke 1, 7, 14, 21, dan 28 yang disimpan pada suhu kamar.

4.6.6. Evaluasi sentrifugasi

Evaluasi sentrifugasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh gravitasi terhadap kestabilan sediaan emulgel dan mikroemulsi. Sebanyak 10 gram sediaan dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 jam. Setiap interval waktu 1 jam diamati ada tidaknya pemisahan pada sediaan.

4.6.7. Evaluasi *freeze-thaw*

Evaluasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh perubahan suhu terhadap kestabilan sediaan. Pengujian dilakukan selama 6 siklus. Satu siklus terdiri dari 48 jam disimpan pada suhu 4°C dan 48 jam pada suhu 40°C. Diamati ada tidaknya pemisahan fase pada suhu kamar pada akhir siklus ke 1, 2, 3, 4, 5 dan 6.

4.6.8. Evaluasi stabilitas dipercepat

Dilakukan dengan menyimpan sediaan pada suhu 40°C dan dilakukan pengamatan organoleptis, pH, dan viskositas pada hari ke 1, 7, 14, 21, 28.

4.7. Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Emulgel dan Mikroemulsi

4.7.1. Penyiapan biakan bakteri *P. acnes*

Sebanyak satu ose dari stock *P. acnes* digoreskan pada nutrisi agar lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil biakan tersebut kemudian disuspensikan dalam 10 ml nutrisi broth steril dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Herlina, 2011:32-33).

4.7.2. Uji aktivitas antibakteri sediaan

Uji aktivitas antibakteri sediaan emulgel dan mikroemulsi menggunakan metode difusi agar. Sebanyak 20 mL media nutrisi agar (NA) yang sudah steril diinokulasi dengan suspensi bakteri *P. acnes* sebanyak 100 µL dipipet dengan pipet mikro lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan kemudian cawan petri digoyang hingga homogen dan dibiarkan memadat. Langkah selanjutnya adalah media agar dilubangi dengan alat khusus (*perforator*) berdiameter 0,6 cm. Sebanyak 1 gram sampel sediaan emulgel dan mikroemulsi yang paling stabil

diencerkan dengan pelarut aquadest sebanyak 3 ml, kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing lubang dan diberi kode sesuai dengan jenis sediaan, lalu diinkubasikan selama 18-24 jam.

Untuk mengetahui pengaruh basis dan eksipien dalam sediaan, maka diuji secara bersamaan basis emulgel dan sediaan emulgel tanpa pengawet, sedangkan mikroemulsi hanya dibandingkan dengan sediaan mikroemulsi tanpa pengawet. Pada pengujian juga digunakan sediaan emulgel mengandung antibiotik klindamisin 1,2% sebagai kontrol positif. Dalam uji ini hasil positif ditandai dengan terbentuknya daerah bening pada daerah lubang, diameter zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri oleh sediaan.