

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah jenis eksperimental. Pada penelitian ini akan dilakukan pembuatan formulasi sediaan serum gel minyak atsiri bunga dengan variasi perlakuan meliputi kontrol 2,5%, 5% dan 7,5%. Terdapat empat variasi kelompok perlakuan uji antioksidan, dan empat variasi kelompok uji antibakteri. Parameter uji pada penelitian ini terdiri dari uji antibakteri, uji antioksidan dan uji stabilitas sediaan serum gel minyak atsiri bunga kenanga (*Cananga odorata* var. *Macrophylla*). Uji aktivitas antioksidan minyak atsiri bunga kenanga (*Cananga odorata* var. *Macrophylla*) dilakukan dengan metode DPPH.

3.2 Sampel

Minyak atsiri bunga kenanga (*Cananga odorata* var. *Macrophylla*) dari PT. Triefta Aroma Nusantara.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan

Bahan Penelitian yang akan digunakan antara lain minyak atsiri bunga kenanga (*cananga odorata*), etanol p.a (Merck KGaA), Dinatrium EDTA, Natrium Benzoat, Gliserin, Trietanolamin, Carbomer, BHI (*Brain Heart Infusion*), NaCl, macfarland 0,5, aquadest (Bratachem), *diphenyl picryl hydrazyl* (DPPH) (Tokyo Chemical Industry CO), bakteri *Propionibacterium acnes*, nutrient agar, bouchardt, dragendorf, mayer, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, gel clindamicyn, dan vitamin C.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu botol gel serum, timbangan analitik (*Electronic scale*), penangas air, gelas ukur (Iwaki), corong glass (Pyrex), tabung reaksi (Iwaki), cawan porselin (Pyrex), erlenmeyer (Iwak), batang pengaduk, mortir dan stamper, viscometer (LR Lamy Rheology Instruments), pH

meter (PH/ISE Meter pH-240L), *obyek glass*, alumunium foil, pipet tetes, kompor listrik, cawan petri, lampu spiritus, kompor listrik (Maspion), jarum ose, Mikropipet (*Fisherbrand*), batang sumuran, mikropipet (*Fisherbrand Elite*), autoklaf (GEA medical YX-24 LDJ), inkubator (LAB INCUBATOR Digital #IN-601 Gemmyco), Jangka sorong (Vernier Caliper) *colony counter*, LAF (*Laminar Air Flow*) (*mascotte*), kertas perkamen, sudip, gelas piala (Pyrex), labu ukur (Pyrex), vial, spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific), *Rotary Evapotaror*, *Water Bath* (Memmert), *Tanur* (Nabertherm), Oven (Gemmyco), Kurs Porselen, Kuvet.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

3.4.1 Tempat Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Teknologi dan Mikrobiologi, dan Laboratorium Instrumental Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.4.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dimulai dari Desember 2022 sampai Juni 2023.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini terdiri dari pengujian antioksidan dengan menguji empat variasi kelompok sediaan serum gel minyak atsiri bunga kenanga dengan konsentrasi berturut-turut yaitu 0%, 2,5%, 5% dan 7,5%.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu pengujian evaluasi sifat fisik produk yang meliputi uji organoleptik (warna, bau dan tekstur), pengukuran pH, uji daya sebar, uji daya lekat, viskositas, homogenitas, pengujian aktivitas antibakteri dan antioksidan sediaan serum gel minyak atsiri bunga kenanga.

3.5.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini merupakan hasil tabel definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1.	Formula	Formulasi	Pengujian	Nominal	K
	serum gel	serum gel	meliputi : uji		F0%
	minyak	minyak kenanga	organoleptik		F2,5%
	kenanga	dengan variasi	(warna, bau		F5%
	untuk uji	konsentrasi	dan tekstur),		F7,5%
	antioksidan	2,5%, 5% dan 7,5%	pengukuran pH, uji daya sebar, dan uji daya lekat.		
Variabel Terikat					
2.	Aktivitas antibakteri serum gel minyak atsiri bunga kenanga	Pengujian berdasarkan daya hambat pada media	-	Rasio	mm (milimeter)
3.	Aktivitas antioksidan serum gel minyak atsiri bunga kenanga	Aktivitas antioksidan dari minyak atsiri bunga kenanga dengan menggunakan metode DPPH dengan	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	Ppm (per part milion)

		mengukur nilai absorbansi			
4.	Ph	Nilai pH sediaan gel disesuaikan dengan nilai pH untuk wajah	pH meter	Rasio	Angka dalam pH meter
5.	Homogenitas	Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan serum pada kaca objek untuk diamati homogenitasnya	Kaca objek	Ordinal	-Tidak homogen -Homogen
6.	Uji organoleptik	Dilakukan dengan menggunakan panca indera, penciuman	Panca indera	Ordinal	- Tidak berbau - Bau khas
7.	Uji viskositas	Menguji kekentalan pada sediaan serum gel	Dilakukan dengan menggunakan viskometer	Viskometer	cps (centipoise)
8.	Uji daya sebar	Kemampuan penyebaran pada sediaan serum gel	Ekstensometer	Rasio	cm (centimeter)

9.	Skrining fitokimia flavonoid	Pengujian dengan pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna	Pereaksi	Nominal	- Positif - Negatif
10.	Skrining fitokimia alkaloid	Pengujian dengan pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna	Pereaksi	Nominal	- Positif - Negatif
11.	Skrining fitokimia tanin	Pengujian dengan pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna	Pereaksi	Nominal	- Positif - Negatif

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi Sampel

Bunga kenanga kuning/hijau dipilih, disimpan dalam wadah terbuka selama kurang lebih 7 hari di tempat yang terang sampai kering dan berubah warna menjadi hitam pekat, lalu ditumbuk dalam lesung sampai halus (Aisyah *et al.*, 2020).

3.6.2 Pembuatan Formula Serum Gel Minyak Atsiri Bunga Kenanga

Berdasarkan hasil penelitian (Rahmi *et al.*, 2022) menunjukkan bahwa formulasi dengan minyak atsiri bunga kenanga 5% memiliki kualitas dan aktivitas antibakteri paling baik pada sediaan krim, berikut peneliti menggunakan konsentrasinya 2,5%, 5% dan 7,5%. Pembuatan formulasi sediaan serum gel minyak atsiri bunga kenanga mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Dyah Ayu,

2021, berikut tabel formulasi sediaan serum gel minyak atsiri bunga kenanga (*Cananga odorata var. Macrophylla*):

Tabel 3.2 Formulasi Serum Gel Minyak Atsiri Bunga Kenanga(*Cananga odorata var. Macrophylla*) yang telah di optimasi

Bahan	Konsentrasi				Fungsi
	F0	F1	F2	F3	
Minyak Atsiri Bunga Kenanga	0%	2,5%	5%	7,5%	Zat Aktif
Carbomer 940	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	Pengental
Gliserin	2%	2%	2%	2%	Humektan
Na benzoat	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	Pengawet
Triethanolamin	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	Penetral
DinatriumEDTA (Na ₂ EDTA)	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	Agen Pengkelat
Aquadest	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Pelarut

Keterangan :

F0: Formula Kontrol Negatif (tanpa minyak atsiri bunga kenanga)

F1: Formula pertama dengan konsentrasi minyak atsiri 2,5%

F2: Formula dua dengan konsentrasi minyak atsiri 5%

F3: Formula tiga dengan konsentrasi minyak atsiri 7,5%

3.6.3 Pembuatan Serum gel Minyak Atsiri Bunga Kenanga

Pembuatan serum gel diawali dengan menimbang masing-masing bahan yang akan digunakan. Kemudian kalibrasi aquades ad 100 ml, lalu panaskan. Masukkan carbomer lalu tambahkan air panas secukupnya gerus hingga mengental. Masukkan minyak atsiri bunga kenanga sedikit demi sedikit gerus hingga mengental. Masukkan gliserin lalu tambahkan aquades secukupnya gerus hingga mengental. Larutkan NA benzoat gerus hingga homogen, tambahkan dinatrium EDTA gerus hingga homogen. Masukkan TEA gerus hingga mengembang, lalu tambahkan sisa aquades gerus hingga homogen. Terakhir masukkan sediaan kedalam botol serum (Dyah Ayu, 2021).

3.7 Evaluasi Fisik Sediaan

A. Uji Organoleptis

Warna dan aroma sediaan gel serum minyak atsiri bunga kenanga merupakan dua perubahan yang dapat dilihat selama uji organoleptik.

B. Uji Homogenitas

Uji ini digunakan untuk mengetahui apakah suatu sediaan mengandung partikel yang homogen atau masih berbutir kasar. Pemeriksaan ini dilakukan dengan cara serum gel sebanyak 0,5g dihipit dengan dua objek glass lalu diamati (Setiawan D, 2018).

C. Uji pH

Tujuan uji pH adalah untuk mengevaluasi keamanan sediaan bila dioleskan secara topikal tanpa mengiritasi kulit. Setelah sediaan dimasukkan ke dalam beaker glass, pH meter dimasukkan untuk diukur pH-nya. Nilai pH sediaan dinyatakan dengan angka pada pH meter. pH 4,5 hingga 6,5 untuk kulit (Rahmatika AS, 2020)

D. Uji Daya Sebar

Uji daya sebar bertujuan untuk memastikan seberapa mudah sediaan menyebar saat dioleskan ke kulit. Timbang sediaan maksimal 0,5 g di tengah gelas dengan balok berukuran milimeter, tutup selama 60 detik, dan ulangi proses setiap 60 detik dengan penambahan bobot 50g, 100g, 150g, dan 200g. Penyebaran kemudian diukur. menyebar standar antara 5 dan 7 cm (Naibaho, 2013).

E. Uji Viskositas

Kekentalan sediaan yang seharusnya memudahkan penyebaran, ditentukan dengan uji viskositas. Untuk melakukan pengujian ini sediaan dimasukkan ke dalam beaker glass 100 ml, viskositas diukur menggunakan *viscometer lamy rheology* dengan spindel 2 diatur pada 100 rpm. Viskositas optimal antara 800 dan 3000 cPs (Naibaho, 2013).

3.8 Uji Aktivitas Antibakteri

Dalam penelitian ini terdapat beberapa tahap uji aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes* ada beberapa poin yang harus dipenuhi sebagai berikut : (Nuraeni W., 2015).

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Setelah dibersihkan dan dikeringkan, alat penelitian dibungkus dengan aluminium foil. Kemudian diautoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C untuk sanitasi. Untuk alat seperti jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara dipijarkan/dipanaskan pada api menyala bunsen.

2. Peremajaan Bakteri

Hal ini dilakukan dengan menggores bakteri *Propionibacterium acnes* secara aseptik ke dalam media *Nutrient Agar* (NA) dalam tabung reaksi, menginokulasinya, dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri uji diambil menggunakan jarum ose, dan dibuat suspensi bakteri dengan cara disuspensi dalam vial berisi 10 ml NaCl 0,9% hingga mencapai kekeruhan yang sama dengan referensi 0,5 Mc. farland

4. Pembuatan Media

Media *Nutrient Agar* (NA) dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditimbang hingga 0,28 gram sebelum dilarutkan dalam 20 ml aquadest. Media kemudian dipanaskan di atas *hot plate*, disterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C dalam autoklaf, kemudian dibiarkan dingin pada suhu kamar sebelum dimasukkan ke dalam cawan petri 20 ml dan dibiarkan mengeras. Selain itu, media diperiksa sterilitasnya setelah disimpan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 24°C.

3.8.2 Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Bunga Kenanga

Metode sumuran adalah salah satu yang diterapkan. Bakteri *Propionibacterium acnes* dibuat terlebih dahulu menjadi suspensi menggunakan standar kekeruhan larutan *MacFarland* 0,5%. Selanjutnya suspensi bakteri sebanyak 100 μ L diambil dengan menggunakan mikropipet, diteteskan pada media agar yang telah dipadatkan, dan didiamkan beberapa saat. Kemudian, dengan menggunakan lubang setipis 7 mm, dibuat 3 lubang pada substrat agar (Muljono, *et al.* 2016). Minyak yang telah dilakukan pengenceran sebanyak 50 μ L dimasukkan ke dalam setiap lubang. Kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Dengan menggunakan jangka sorong, diameter daerah bening di sekitar sumur pada masing-masing sampel diukur untuk menentukan zona hambat.

3.8.3 Uji Antibakteri Sediaan Serum Gel

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode sumuran menggunakan sampel dan pembanding (gel clindamycin). Bakteri uji *Propionibacterium acnes* ditumbukan pada media *nutrient agar* dengan cara menggoreskan bakteri biakan murni menggunakan jarum ose pada media. Bakteri yang sudah digoreskan pada media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni bakteri uji pada media biakan NA umur 48 jam diambil sebanyak 1 ose, kemudian dimasukkan kedalam tabung berisi aquades steril. Suspensi bakteri uji diambil sebanyak 100 μ L, dituang secara merata pada media NA menggunakan *spread plate*. Media ditunggu sampai mengeras, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam, kemudian hasil zona bening diukur dengan jangka sorong, perbedaan luas zona bening menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antibakteri, semakin besar luas zona bening menunjukkan semakin besar kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri (Agung Nur *et al.*, 2022).

3.9 Uji Aktivitas Antioksidan

3.9.2 Uji Aktivitas Antioksidan Minyak Atsiri Bunga Kenanga

Tiga jumlah minyak atsiri bunga kenanga yang berbeda 2,5%, 5%, dan 7,5% digunakan dalam pengujian antioksidan. 10 mL larutan DPPH (etanol) 0,25 mL digunakan untuk melarutkan 1 mL bahan. Setelah 30 menit diinkubasi dalam lemari, larutan dikeluarkan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517

nm dengan spektrofotometer. Menurut prosedur yang diuraikan di atas, 1 mL etanol dengan penambahan larutan DPPH digunakan sebagai kontrol. Kontrol positif menjalani prosedur pengujian yang sama dengan sampel, menggunakan vitamin C sebagai acuan (Pujiarti dkk, 2015).

3.9.3 Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Serum Gel

Teknik DPPH digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan. Sampel dilarutkan dalam metanol PA, ditambahkan, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang menggunakan wadah gelap dengan perbandingan volume larutan stok DPPH (1:1). Absorbansi kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm. Selanjutnya persen hambat masing-masing larutan diketahui dengan menggunakan rumus (Yanni D., 2018) :

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{(\text{abs kontrol} - \text{abs sampel})}{\text{abs kontrol}} \times 100$$

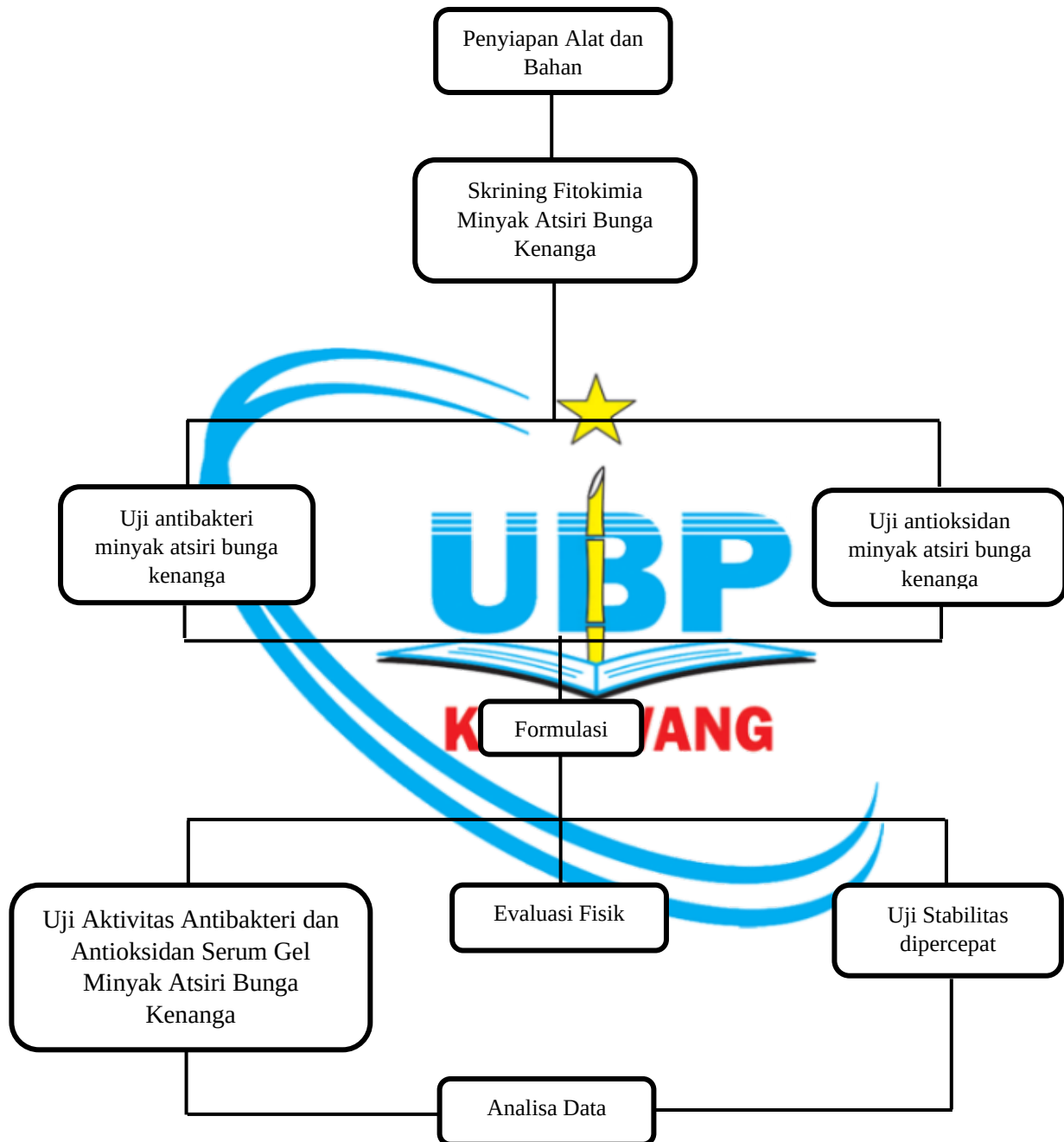
Setelah didapatkan % aktivitas hambatan diperoleh nilai IC_{50} melalui persamaan regresi linier $y = bx + a$, dimana y adalah % hambat (senilai 50) dan x adalah nilai IC_{50}

3.10 Uji Stabilitas Sediaan Serum

Untuk menilai stabilitas formulasi serum gel berdasarkan penyimpanan pada berbagai suhu dilakukan pengujian sediaan serum gel. Menimbang 2 gram serum wajah untuk masing-masing formula ke dalam 8 vial yang tertutup rapat, dilakukan uji stabilitas dengan Metode *Freeze and Thaw*. 4 vial digunakan untuk siklus *Freeze dan Thaw*, dengan 4 vial disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu 40°C selama 24 jam. Proses ini dihitung sebagai 1 siklus. Sebanyak 4 vial digunakan sebagai kontrol, yang disimpan pada suhu 27°C. Perhatikan perubahan organoleptik hingga 6 siklus harus dilakukan, dengan pH setiap siklus dan perubahan organoleptik (bentuk dan warna) dicatat (Liandhajani, 2022). Menurut Anggai *et al.* (2013), suatu sediaan dianggap stabil jika homogen, memiliki pH konstan, dan tidak menunjukkan perubahan organoleptik.



3.11 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir

3.12 Analisa Data

Sedangkan data evaluasi dari hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dan aktivitas antioksidan dianalisis menggunakan uji *oneway ANOVA SPSS (statistical product and service solution)* untuk mengetahui perbedaan masing-masing konsentrasi, data evaluasi sifat fisik serum gel meliputi organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, dan uji stabilitas dipercepat.



