

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman bunga sepatu

Tahapan pertama penelitian ini adalah dengan melakukan determinasi tanaman bunga sepatu yang bertujuan untuk mencocokkan morfologi bunga sepatu sesuai dengan literature. Determinasi tanaman dilakukan dibagian Biologi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret.

Berdasarkan hasil determinasi 1b-2b-3b-4b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-30b-32a-32a-33a-34a-35a-36d-37d-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74b-631b-632b-633b-634b-635b-636b-637b-638a-639b-640b-652d-653b-655b-656a-657b-658a-659b-660a _____96. Malvaceae

1b-3b-5b-13b-14b-15a-16b _____13. *Hibiscus*
1a-2b-4b-5b-20b-21a-22b _____ *Hibiscus rosa-sinensis* L.

dinyatakan bahwa benar tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah benar bunga sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). Hasil determinasi yang dilakukan dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk bunga sepatu

Bunga sepatu yang telah dikeringkan dengan oven, dihitung bibit kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada .Hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah bunga sepatu dapat dilihat pada lampiran 12.

Tabel 3. Presentase bobot kering terhadap bobot basah bunga sepatu

Bobot basah	Bobot kering	Presentase
10000 gram	800 gram	8%

Hasil dari bobot basah bunga sepatu 10000 gram, diperoleh bobot kering bunga sepatu 800 gram dan diperoleh presentasi 8% yang berarti hasil rendemen tersebut menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung di dalam bunga sepatu. Bunga sepatu segar dan kering dapat dilihat pada lampiran 2.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk bunga sepatu

Hasil penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Penetapan susut pengeringan adalah

pengukuran sisa zat setelah pengeringan nilai persen atau sampai berat konstan. Tujuan penetapan kadar lembab adalah untuk memberikan batasan maksimal terhadap besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Hasil penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk bunga sepatu

No	Bobot awal (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	7,3
2	2	7,6
3	2	8,4
Rata-rata		7,7

Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan bunga sepatu adalah 7,7%. Kadar lembab yang rendah menyebabkan sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno *et al*, 2008). Kadar lembab yang tinggi dapat kemungkinan simplisia akan rusak dan ditumbuhi mikrob. Pengeringan menggunakan oven mempunyai keuntungan bahwa dengan suhu yang stabil akan menghambat pertumbuhan jamur. Perhitungan penetapan susut pengeringan serbuk bunga sepatu dapat dilihat pada lampiran 14.

Tabel 5. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak bunga sepatu

No	Bobot awal (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	8,1
2	2	8,4
3	2	9,0
Rata-rata		8,5

Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan ekstrak bunga sepatu adalah 8,5%. Kadar lembab yang rendah menyebabkan sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno *et al*, 2008). Kadar lembab yang tinggi dapat kemungkinan simplisia akan rusak dan ditumbuhi mikrob. Pengeringan menggunakan oven mempunyai keuntungan bahwa dengan suhu yang stabil akan menghambat pertumbuhan jamur.

4. Pembuatan ekstrak bunga sepatu

Serbuk bunga sepatu diekstraksi dengan metode maserasi, kemudian ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan dalam evaporator pada suhu 40°C. Hasil pembuatan ekstrak etanol bunga sepatu dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil pembuatan ekstrak bunga sepatu

Bobot serbuk	Boobot ekstrak (g)	Rendemen ekstrak(%)
700 gram	65 gram	9,25

Hasil tabel ekstrak bunga sepatu diperoleh dari proses maserasi dengan menggunakan etanol 70% memiliki rendemen 9,25%, yang berarti hasil rendemen tersebut menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung di dalam bunga sepatu. Perhitungan hasil pembuatan ekstrak dapat dilihat pada lampiran 15.

5. Uji organoleptis ekstrak bunga sepatu

Organoleptis ekstrak berwarna hitam, ekstrak kental, bau aromatik.

6. Uji bebas etanol bunga sepatu

Ekstrak bunga sepatu dilakukan uji bebas etanol. Uji bebas etanol bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri. Hasil uji dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 7. Hasil pembuatan ekstrak etanol 70% bunga sepatu

Prosedur	Hasil	Pustaka
Ekstrak + H ₂ SO ₄ + CH ₃ COOH dipanaskan	tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Depkes 1997)

Hasil uji bebas etanol pada tabel menunjukkan bahwa ekstrak bunga sepatu sudah terbebas dari pelarutnya yaitu etanol yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak

Identifikasi kandungan kimia ekstrak bunga sepatu dilakukan dengan mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam bunga sepatu. Identifikasi pada senyawa flavonoid, saponin, antosianin, polifenol, dan alkaloid. Hasil identifikasi kandungan ekstrak dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 8. Hasil identifikasi kandungan senyawa ekstrak bunga sepatu.

Kandungan Kimia	Pustaka	Hasil	Interpretasi hasil
Flavonoid	Warna merah atau jingga/kuning pada lapisan amil alkohol (Prameswari <i>et al.</i> 2014).	Terbentuk warna merah	+
Saponin	Reaksi + bila busa masih terbentuk 1-10 cm setelah pengocokan (Praweswari <i>et al.</i> 2014).	Terbentuk busa	+
Antosianin	Warna merah pudar (Lydia <i>et al.</i> 2011)	Terbentuk warna merah pudar	+

Polifenol	Warna hijau kecoklatan menunjukkan adanya tannin dan terbentuk warna selain warna ini menubjukan adanya senyawa polifenol (Evi 2015)	Hijau kecoklatan	+
Alkaloid	Dragendrof : endapan coklat sampai hitam (Depkes 1978).	Terbentuk endapan coklat	+

8. Hasil pembuatan sediaan gel

Pembuatan sediaan gel bunga sepatu menggunakan karbopol, gliserin, trietanolamin dan metyl paraben. Basis gel dipilih karbopol karena dapat membentuk gel dengan viskositas tinggi dan tingkat kejernihan baik, selain itu karbopol juga bersifat hidrofilik, sehingga mudah terdispersi dalam air dan konversi kecil antara 0,05-2,00% mempunyai kekentalan yang cukup baik sebagai basis gel dan memiliki penampakan secara organoleptis yang lebih baik menarik serta daya sebar yang lebih baik dan juga digunakan gliserin yang berfungsi sebagai humektan. Humektan membantu menjaga kelembaban kulit dengan mekanisme yaitu menjaga kandungan air pada lapisan stratum korneum serta mengikat air dari lingkungan ke kulit. Range konsentrasi gliserin sebagai humektan adalah 0,5-15% (Rowe *et al.* 2009).

Metyl paraben yang lebih baik dibandingkan dengan propel paraben karena kelarutannya dalam air lebih baik. Kelarutan metyl paraben dalam air yaitu 1:4000. Metyl paraben juga berfungsi sebagai antimikroba dan stabil pada berair dengan pH sekiytar 3-7. Konsentrasi metyl paraben yang digunakan sebagai antimikroba pada sediaan topical yaitu 0,02-0,03%. Trietenolamin digunakan sebagai agen pembasah (meningkatkan pH sediaan agar mencapai pH yang sesuai karakteristik pH kulit yaitu 5,5-6,5, selaian itu juga dapat digunakan sebagai *emulsifying agent* (pembentuk massa gel) (Rowe *et al.* 2009).

Formulasi gel ekstrak bunga sepatu dimulai dengan tahap pengembangan karbopol dengan aquadest yang didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya proses *mixing*, metyl paraben dilarutkan terlebih dahulu dengan aquadest dan gliserin secara berurutan kemudian tambahkan trietanolamin. Campuran ini kemudian ditambahkan pada karbopol yang telah dikembangkan lalu dilakukan proses *mixing* menggunakan mortir dengan skala putar yang stabil setelah terbentuk sediaan gel kemudian diwadahi dan ditutup dan disimpan pada suhu kamar.

9. Hasil uji sifat fisik gel

Uji sifat fisik gel dilakukan untuk mengetahui karakteristik dari sediaan gel ekstrak bunga sepatu. Uji sifat fisik meliputi organoleptis, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji daya sebar, dan uji pH.

9.1 Uji homogenitas. Uji homogenitas dilakukan agar mengetahui sediaan gel setelah penyimpanan 1, 2 dan 3 minggu. Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara gel dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan yang cocok kemudian diamati apakah sediaan gel menunjukkan susunan yang homogen. Gel yang baik tidak terdapat butiran kasar (Veronika 2018).

Tabel 9. Uji homogenitas sediaan gel ekstrak bunga sepatu

Pemeriksaan	Waktu	Formulasi I 15%	Formulasi II 20%	Formulasi III 25 %	Kontrol negatif
Homogenitas	Minggu 0	Homogen	Homogen	Homogen	Homogen
	Minggu 1	Homogen	Homogen	Homogen	Homogen
	Minggu 2	Homogen	Homogen	Homogen	Homogen
	Minggu 3	Homogen	Homogen	Homogen	Homogen

Tabel 9 menunjukkan bahwa homogenitas gel bunga sepatu adalah homogen. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya butiran-butiran pada kaca yang terdapat pada gel bunga sepatu.

9.2 Uji Organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mendeskripsikan warna, bau, dan konsistensi dari sediaan, sediaan yang dihasilkan sebaiknya memiliki warna yang menarik, bau yang menyenangkan dan konsistensi yang bagus. Hasil yang diperoleh terhadap pemeriksaan organoleptis gel bunga sepatu dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 10. Hasil pemeriksaan organoleptis gel bunga sepatu

Pemeriksaan	Waktu	Formulasi I 15%	Formulasi II 20%	Formulasi III 25%	Kontrol negatif
Warna	Minggu 0	Coklat	Coklat	Coklat	Bening
	Minggu 1	Coklat	Coklat	Coklat	Bening
	Minggu 2	Coklat	Coklat	Coklat	Bening
	Minggu 3	Coklat	Coklat	Coklat	Bening
Bau	Minggu 0	Aromatik	Aromatik	Aromatik	Khas
	Minggu 1	Aromatik	Aromatik	Aromatik	Khas
	Minggu 2	Aromatik	Aromatik	Aromatik	Khas
	Minggu 3	Tidak berbau	Tidak berbau	Tidak berbau	Khas
Konsistensi	Minggu 0	Gel	Gel	Gel	Gel
	Minggu 1	Gel	Gel	Gel	Gel
	Minggu 2	Gel	Gel	Gel	Gel
	Minggu 3	Gel	Gel	Gel	Gel

Tabel 10 menunjukkan bahwa gel dari minggu kedua hingga minggu keempat mempunyai warna coklat dikarenakan proses dari pengadukan yang merata. Bau yang dihasilkan menunjukkan bahwa pada penyimpanan minggu pertama memiliki aromatik tetapi setelah beberapa minggu bau berkurang menjadi tidak berbau seperti semula. Hal ini disebabkan pengharum yang digunakan menguap dan tidak bisa bertahan lama dalam campuran basis yang konsentrasi ekstrak bunga sepatu lebih banyak. Sediaan gel menggunakan konsentrasi ekstrak bunga sepatu dan konsentrasi karbopol yang berbeda-beda dalam tiap formula yang dapat membedakan setiap konsistensi tiap formula. Konsistensi gel pada minggu pertama berbeda yang disebabkan awal dari pembuatan gel yang saat pada pengadukan dan pencampuran dari masing-masing gel.

9.3 Uji viskositas. Viskositas merupakan suatu pernyataan tahanan dari suatu cairan untuk mengalir, makin tinggi viskositasnya makin besar tahanannya. Uji viskositas bertujuan untuk mengetahui konsistensi suatu sediaan yang berpengaruh pada penggunaan topikal. Viskositas gel harus dapat membuat gel mudah diambil dari wadahnya dan mudah dioleskan, tetapi menempel pada kulit. Viskositas sangat berpengaruh terhadap efektivitas terapi yang diinginkan serta kenyamanan penggunaan sehingga tidak boleh terlalu keras dan terlalu encer. Viskositas gel yang terlalu encer akan menyebabkan waktu daya lekat dari basis gel sebentar sehingga efektifitas penghantaran zat aktif menjadi rendah, dan jika viskositas sediaan terlalu kental dapat memberikan ketidaknyaman pada saat digunakan. Semakin tinggi konsentrasi karbopol maka akan semakin tinggi viskositas gel, meningkatnya viskositas ini maka karena karbopol dapat mengembang ketika terdispersi dalam air membentuk suatu koloid. Namun sediaan tidak boleh terlalu tinggi maupun terlalu rendah, karena viskositas yang terlalu tinggi akan membuat gel semakin kental yang mengakibatkan pada kesulitan obat terlepas dari sediaan gel, sedangkan jika viskositas terlalu rendah maka akan menurunkan lama waktu gel tinggal di kulit saat digunakan. Hasil pengamatan viskositas gel ekstrak bunga sepatu dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil rata-rata viskositas \pm SD gel ekstrak bunga sepatu.

Formula	Waktu	Viskositas			rata-rata	\pm SD
		replikasi 1	replikasi 2	replikasi 3		
1	minggu 0	220	240	250	236.667	\pm 15.275
	minggu 1	250	250	260	253.333	\pm 5.773
	minggu 2	260	250	270	260	\pm 10
	minggu 3	260	260	270	263.333	\pm 5.773
2	minggu 0	450	430	420	433.333	\pm 15.275
	minggu 1	470	440	390	433.333	\pm 40.414
	minggu 2	480	450	440	456.667	\pm 20.816
	minggu 3	480	460	450	463.333	\pm 15.275
3	minggu 0	840	840	830	836.667	\pm 5.773
	minggu 1	850	860	860	856.667	\pm 5.773
	minggu 2	890	870	870	876.667	\pm 11.547
	minggu 3	900	890	890	893.333	\pm 5.773
kontrol -	minggu 0	420	410	390	406.667	\pm 15.275
	minggu 1	430	410	400	413.333	\pm 15.275
	minggu 2	450	420	420	430	\pm 17.320
	minggu 3	460	420	430	436.667	\pm 20.816

Hasil uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan bahwa nilai signifikansinya sebesar $0,053 > 0,05$ artinya data yang diuji terdistribusi normal. Selanjutnya data di uji dengan *Test of Homogeneity of Variances* untuk mengetahui data terdistribusi homogen atau tidak. Hasil analisis menunjukkan bahwa $0,251 > 0,05$ yang artinya data tersebut terdistribusi homogen. Berdasarkan tabel *tukey test* menunjukkan tanda (*) pada angka *mean difference*, artinya hasil viskositas formula 1, formula 2, formula 3 dan kontrol negatif menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Analisis *homogeneous subtests* ini untuk mencari grup/substes mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *homogeneous* terbagi dalam 4 subtes, disimpulkan bahwa formula terbaik pada sediaan mutu konsentrasi ekstrak bunga sepatu 20% dengan perbandingan karbopol 1,5% karena nilai subset mendekati nilai kontrol negatif. Hasil analisis uji *one way ANOVA* dapat dilihat pada lampiran 18.

9.4 Uji pH. Uji pH dilakukan untuk mengetahui apakah kadar pH dalam sediaan gel memenuhi persyaratan untuk sediaan topical. Hasil pengamatan uji pH gel ekstrak bunga sepatu pada tabel 12 menunjukkan bahwa penyimpanan selama 3 minggu, sediaan gel mengalami penurunan dan kenaikan pada pH. Kemungkinan disebabkan oleh pengaruh lingkungan seperti gas-gas di udara yang bersifat asam dan masuk ke dalam gel, akan tetapi pada penurunan dan kenaikan pH yang terjadi pada setiap formulasi tidak terlalu signifikan dan sehingga dapat dikatakan bahwa sediaan relatif dalam rentang 6,34-6,81, pH tersebut memenuhi

syarat sediaan topical yaitu 5,0-6,8 (ansari 2009). Kulit yang normal memiliki pH 5,0-6,8 sehingga sediaan topical memiliki pH yang sama dengan pH normal kulit. Kesesuaian pH kulit dengan sediaan topikal mempengaruhi penerimaan kulit terhadap sediaan. Sediaan topikal yang ideal adalah tidak mengiritasi kulit. Kemungkinan iritasi kulit akan sangat besar apabila sediaan terlalu asam atau terlalu basa. Hasil penentuan pH sediaan gel dengan menggunakan pH meter dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil rata-rata uji pH

Formula	Waktu	Pengujian Ph			Rata-rata	±SD
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3		
1	minggu 0	6.49	6.51	6.78	6.593	±0.161
	minggu2	6.61	6.41	6.81	6.61	±0.2
2	minggu 0	6.61	6.51	6.68	6.6	±0.085
	minggu 2	6.73	6.69	6.79	6.737	±0.050
3	minggu 0	6.74	6.65	6.75	6.713	±0.055
	minggu 2	6.63	6.8	6.81	6.746	±0.101
kontrol -	minggu 0	6.3	6.59	6.4	6.43	±0.147
	minggu 2	6.49	6.2	6.35	6.346	±0.145

Hasil uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan bahwa nilai signifikansinya sebesar $0,564 > 0,05$ artinya data yang diuji terdistribusi normal. Selanjutnya data di uji dengan *Test of Homogeneity of Variances* untuk mengetahui data terdistribusi homogen atau tidak. Hasil analisis menunjukkan bahwa $0,233 > 0,05$ yang artinya data tersebut terdistribusi homogen. Berdasarkan tabel *tukey test* menunjukkan tanda (*) pada angka *mean difference*, artinya hasil pH kontrol negatif menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Analisis *homogeneous subtests* ini untuk mencari grup/substes mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *homogeneous* terbagi dalam 2 subtes, disimpulkan bahwa formula terbaik pada sediaan mutu konsentrasi ekstrak bunga sepatu 15% dengan perbandingan karbopol 1% karena nilai subset mendekati nilai kontrol negatif. Hasil analisis uji *one way ANOVA* dapat dilihat pada lampiran 18.

9.4 Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan untuk mengetahui kemampuan gel untuk menempel pada permukaan kulit. Semakin besar daya lekat gel absorpsi obat akan semakin besar karena ikatan yang terjadi antara gel dengan kulit semakin lama, sehingga basis dapat melepaskan obat lebih optimal. Hasil rata-rata daya lekat gel 3 replikasi ditunjukkan pada tabel 13.

Tabel 13. Hasil rata-rata uji daya lekat

Formula	waktu	daya lekat(detik)			rata-rata	± SD
		replikasi 1	replikasi 2	replikasi 3		
1	minggu 0	3.74	3.41	3.82	3.657	±0.217
	minggu 1	3.87	3.51	3.99	3.79	±0.249
	minggu 2	3.89	3.57	4.01	3.833	±0.227
	minggu 3	4.4	4.73	4.29	4.473	±0.228
2	minggu 0	4.42	4.48	4.67	4.523	±0.130
	minggu 1	5.82	5.9	5.73	5.817	±0.085
	minggu 2	5.97	5.93	5.85	5.917	±0.061
	minggu 3	6.37	6.49	6.53	6.463	±0.083
3	minggu 0	6.7	6.65	6.79	6.713	±0.070
	minggu 1	6.9	7.43	7.82	7.383	±0.461
	minggu 2	7.11	7.49	7.92	7.507	±0.405
	minggu 3	8.62	8.72	8.89	8.743	±0.136
kontrol -	minggu 0	5.71	5.61	5.8	5.707	±0.095
	minggu 1	5.8	5.72	5.87	5.797	±0.075
	minggu 2	5.84	5.8	5.89	5.843	±0.045
	minggu 3	5.87	5.87	5.91	5.883	±0.023

Hasil uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan bahwa nilai signifikansinya sebesar $0,339 > 0,05$ artinya data yang diuji terdistribusi normal. Selanjutnya data di uji dengan *Test of Homogeneity of Variances* untuk mengetahui data terdistribusi homogen atau tidak. Hasil analisis menunjukkan bahwa $0,500 > 0,05$ yang artinya data tersebut terdistribusi homogen. Berdasarkan tabel *tukey test* menunjukkan tanda (*) pada angka *mean difference*, artinya hasil daya lekat formula 1, formula 2, formula 3 dan kontrol negatif menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Analisis *homogeneous subtests* ini untuk mencari grup/substes mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *homogeneous* terbagi dalam 3 subtes, disimpulkan bahwa formula terbaik pada sediaan mutu konsentrasi ekstrak bunga sepatu 25% dengan perbandingan karbopol 2% karena nilai subset mendekati nilai kontrol negatif. Hasil analisis uji *one way ANOVA* dapat dilihat pada lampiran 18.

9.5 Uji daya sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan mengetahui penyebaran gel dipermukaan kulit. Daya sebar gel dapat menentukan adsorpsinya pada tempat pemakaian, semakin baik daya sebar maka akan semakin banyak gel yang diadsorpsi suatu sediaan disukai bila dapat menyebar dengan mudah dikulit, karena pemakaiannya lebih mudah dan nyaman. Timbang 0,5 g gel, kemudian diletakkan ditengah alat (kaca bulat) kemudian timbanglah dahulu kaca yang satunya. Letakkan kaca tersebut diatas masa gel dan biarkan selama 1 menit.

Lalu ukurlah berapa diameter gel yang menyebarkan (dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi) kemudian tambahkan 50 g beban tambahan, diamkan selama 1 menit dan catatlah diameter gel yang menyebarkan seperti sebelumnya. Kemudian teruskan dengan menambah tiap kali dengan beban tambahan 50 g dan catat diameter gel yang menyebarkan, setelah 1 menit. Kemudian ulangi masing-masing 3 kali untuk tiap gel yang tersisa. Kemudian buat grafik hubungan antara beban dan luas yang menyebarkan (Lena *et al.* 2015).

Pengujian daya sebar menunjukkan bahwa dengan penambahan ekstrak yang berbeda dan penambahan karbopol yang berbeda setiap konsentrasinya maka akan menyebabkan daya sebar yang berbeda setiap konsentrasinya. Daya sebar erat hubungannya dengan viskositas, bila viskositas tinggi maka daya sebar akan menurun, bila viskositas menurun maka daya sebar akan luas, dari pengamatan ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak bunga sepatu yang dilarutkan dengan basis gel memiliki hasil yang baik karena faktor penambahan ekstrak bunga sepatu dapat mempengaruhi luas permukaan yang dapat dijangkau oleh gel. Hasil daya sebar dapat dilihat pada tabel 14.

Tabel 14. Hasil rata-rata daya sebar

Formulasi	Waktu	Beban	Daya sebar (cm)			rata-rata	±SD
			Replikasi	Replikasi	Replikasi		
			1	2	3		
1	minggu 0	tanpa beban	2.075	2.075	2.4	2.183	±0.187
		50	3.05	3.4	3.15	3.2	±0.180
		100	3.4	3.8	3.55	3.583	±0.202
	minggu 1	tanpa beban	4	4.15	4.325	4.158	±0.162
		50	4.225	4.375	4.65	4.417	±0.215
		100	4.6	4.75	5.075	4.808	±0.242
	minggu 2	tanpa beban	3.15	3.15	3.1	3.133	±0.028
		50	4.525	4.525	4.65	4.567	±0.072
		100	5.125	5.05	5.275	5.15	±0.114
	minggu 3	tanpa beban	3.15	3.325	3.425	3.3	±0.139
		50	4.75	4.625	4.625	4.667	±0.072
		100	5.25	5.55	5.3	5.367	±0.160
2	minggu 0	tanpa beban	2.05	2.2	2.45	2.233	±0.202
		50	3.35	3.4	3.15	3.3	±0.132
		100	4.2	3.8	3.5	3.833	±0.351
	minggu 1	tanpa beban	2.05	2.45	2.15	2.217	±0.208
		50	3.65	3.575	3.4	3.547	±0.128
		100	3.8	4.075	3.95	3.947	±0.137
	minggu 2	tanpa beban	2.075	2.075	2.075	2.075	±0
		50	3.75	3.55	3.625	3.647	±0.101
		100	4.125	4.35	4.525	4.333	±0.200
	minggu 3	tanpa beban	2.075	2.05	2.125	2.083	±0.038
		50	4.2	4.4	4.375	4.325	±0.108

Formulasi	Waktu	Beban	Daya sebar (cm)			rata-rata	±SD
			Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3		
3	minggu 0	100	4.525	4.65	4.675	4.617	±0.080
		tanpa beban	2.15	2.05	2.2	2.133	±0.076
		50	3.05	3.375	3.575	3.333	±0.264
	minggu 1	100	3.55	3.75	3.775	3.697	±0.123
		tanpa beban	2.075	2.05	2.05	2.058	±0.014
		50	3.175	3.45	3.7	3.447	±0.262
	minggu 2	100	3.6	3.75	3.8	3.717	±0.104
		tanpa beban	2.075	2.125	2.1	2.1	±0.025
		50	3.15	3.525	3.85	3.508	±0.350
	minggu 3	100	3.75	3.7	3.8	3.75	±0.05
		tanpa beban	2.05	2.05	2.075	2.058	±0.014
		50	3.45	3.675	3.825	3.65	±0.188
kontrol -	minggu 0	100	3.75	3.775	3.85	3.797	±0.052
		tanpa beban	2	2.1	2	2.033	±0.057
		50	2.525	2.3	2.35	2.397	±0.118
	minggu 1	100	3	3.075	3.425	3.167	±0.226
		tanpa beban	3	3.075	2.85	2.975	±0.114
		50	3.325	3.275	3.275	3.291	±0.028
	minggu 2	100	4	4.15	4.225	4.125	±0.114
		tanpa beban	3	3	2.75	2.916	±0.144
		50	4.2	4.125	3.475	3.933	±0.398
	minggu 3	100	4.675	4.525	4.1	4.433	±0.298
		tanpa beban	4	4.125	4.15	4.091	±0.080
		50	4.475	4.35	4.45	4.425	±0.066
		100	5	5.25	5.275	5.175	±0.152

Hasil uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan bahwa nilai signifikansinya sebesar $0,054 > 0,05$ artinya data yang diuji terdistribusi normal. Selanjutnya data di uji dengan *Test of Homogeneity of Variances* untuk mengetahui data terdistribusi homogen atau tidak. Hasil analisis menunjukkan bahwa $0,524 > 0,05$ yang artinya data tersebut terdistribusi homogen. Berdasarkan tabel *tukey test* menunjukkan tanda (*) pada angka *mean difference*, artinya hasil daya sebar formula 1, formula 2, dan formula 3 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Analisis *homogeneous subtests* ini untuk mencari grup/substes mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *homogeneous* terbagi dalam 2 subtes, disimpulkan bahwa formula terbaik pada sediaan mutu konsentrasi ekstrak bunga sepatu 15% dengan perbandingan karbopol 1% karena nilai subset mendekati nilai kontrol negatif. Hasil analisis uji *one way ANOVA* dapat dilihat pada lampiran 18.

2. Identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

2.1 Identifikasi cawan gores. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi pada media PSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan penampakan koloninya berwarna hijau kebiruan yang dihasilkan oleh pigmen pyocyanin, koloni berbentuk bulat dan halus (Jawetz *et al* 2007). Hasil inokulasi dapat dilihat pada lampiran 8.

2.2 Identifikasi pewarnaan. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan Gram negatif yang berbentuk batang. Pewarnaan Gram dilakukan untuk menyakinkan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan Gram negatif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan pemberian zat warna dasar Kristal violet (Gram A). Kemudian diberikan larutan iodine (Gram B) dan keseluruhan bakteri akan terwarnai menjadi biru dalam proses pewarnaan. Kemudian sel diberikan alkohol (Gram C). Sel Gram positif akan mempertahankan kompleks Kristal violet dengan iodine sehingga tetap berwarna ungu, kemudian diberikan zat warna berupa safranin (Gram D) sehingga *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 akan berwarna merah. Hal ini disebabkan karena dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai kandungan lipida yang tinggi dalam bentuk lipopolisakarida dan lipoprotein. Lipida pada dinding sel bakteri Gram negatif larut oleh alkohol sehingga pori-pori mengembang dan menyebabkan kompleks Kristal violet dengan iodine keluar dari sel, akibatnya dinding sel bakteri menjadi tidak berwarna. Dinding sel bakteri yang tidak berwarna tersebut akan menyerap zat warna safranin sehingga sel bakteri akan tampak berwarna ketika dilihat dibawah mikroskop. Hasil dengan adanya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ditandai berwarna merah dan berbentuk batang. Hasil pewarnaan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada lampiran 9.

2.3 Identifikasi uji biokimia. Hasil identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara biokimia dapat dilihat pada tabel 15.

Tabel 15. Identifikasi uji biokimia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Media	Hasil	Pustaka (WHO 2003)
SIM	--+	--+
KIA	K/KS ⁻	K/KS ⁻
LIA	K/KS ⁻	K/KS ⁻
CITRAT	+	+

Keterangan :

SIM : *Sulfida Indol Agar*

K : Alkali (basa)

KIA : *Kligor Iron Agar*

S : Sulfida

LIA : *Lysine Iron Agar*

- : Reaksi negatif

+ : Reaksi positif

Hasil pengamatan pada media SIM (*Sulfida Indol Agar*) menunjukkan sulfida (-) karena tidak terbentuk warna hitam pada medium SIM yang artinya *Pseudomonas aeruginosa* tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfat (H_2SO_4), indol (-) karena setelah ditambah reagen Erlich A dan B diatas media, diamati permukaan media tidak berwarna merah artinya *Pseudomonas aeruginosa* tidak membentuk indol karena tidak terjadi pemecahan asam amino triptopan oleh enzim triptonase sebagai salah satu sumber karbon sehingga tidak terjadi reaksi antara indol dan paradimetil amino bensaldehid yang akan membentuk indol yang berwarna merah, motilitas (+) karena pertumbuhan bakteri yang menyebar pada bekas tusukan.

Hasil pengujian pada medium KIA (*Kliger's Iron Agar*) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan media KIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^{\circ}C$ menunjukkan hasil K/K S-. Hasil K/K artinya lereng dan dasar media berwarna merah, yang menunjukkan bahwa bakteri tidak menfermentasi glukosa dan laktosa. Hasil S- artinya H_2S negatif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H_2S . H_2S akan bereaksi dengan Fe^{+} yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam.

Hasil pengujian pada medium LIA (*Lysin Iron Agar*) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfide. Pengujian LIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^{\circ}C$ menunjukkan hasil K/K S-. Hasil K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarbolasi lisin yang menyebabkan reaksi basa sehingga berwarna ungu di seluruh media. Hasil S- artinya uji H_2S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan

H₂S. H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺ yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam.

Hasil pengujian pada medium CITRAT untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrate sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian medium CITRAT setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil positif berwarna biru artinya *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan hasil bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil pengamatan dengan menggunakan identifikasi uji biokimia dapat dilihat pada lampiran 10.

3. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan bakteri menggunakan media BHI dengan standar kekeruhan menggunakan pembandingkan *Mc Farland* 0,5. Jika sangat keruh maka diencerkan tetapi kurang keruh maka diinkubasi lagi. Standar kekeruhan *Mc Farland* ini bertujuan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri. Hasil suspensi bakteri yang didapat kekeruhannya tidak standar dengan *Mc Farland* 0,5. Suspensi bakteri distandarkan dengan *Mc Farland* 0,5 hingga tingkat kekeruhannya sama dengan *Mc Farland* 0,5.

4. Uji aktivitas antibakteri bunga sepatu dengan metode difusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi menggunakan metode difusi. Metode difusi bertujuan untuk mengetahui zona hambat di sekitar disk cakram yang dinyatakan dalam mm, daerah yang jernih disekitar disk cakram memiliki daya hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil uji difusi dapat dilihat pada tabel 16.

Tabel 16. Hasil rata-rata zona hambat

Formula	replikasi 1	replikasi 2	replikasi 3	rata-rata	SD
1	7.75	8	8	7.916	±0.144
2	9	9.25	9	9.083	±0.144
3	11.75	10.75	10	10.833	±0.877
kontrol +	20	20	20	20	±0
kontrol -	0	0	0	0	±0

Hasil uji difusi menunjukkan gel ekstrak bunga sepatu dengan konsentrasi 25% ekstrak dan 2% karbopol memiliki daya hambat yang lebih besar dari konsentrasi 15% ekstrak dengan karbopol 1% dan 20% ekstrak dengan 1,5% karbopol. Kontrol positif gentamisin memiliki zona hambat terhadap bakteri Gram negatif yaitu bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25783. Sedangkan untuk kontrol negatif menggunakan gel tanpa ekstrak bunga sepatu yang ditunjukkan tidak adanya zona hambat pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25783.

Hasil uji difusi dari tabel diatas di uji kebenarannya dengan menggunakan uji SPSS *one way annova*. Uji ini digunakan untuk membandingkan sampel pada setiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan *one way annova* adalah Formulasi 1, Formulasi 2, Formulasi 3, kontrol positif, kontrol negatif. Kontrol positif dan kontrol negatif untuk mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan bahwa nilai signifikansinya sebesar $0,543 > 0,05$ maka H_0 diterima, artinya data yang diuji terdistribusi normal. Selanjutnya data di uji dengan *Test of Homogeneity of Variances* untuk mengetahui data terdistribusi homogen atau tidak. Hasil analisis menunjukkan bahwa $0,124 > 0,05$ yang artinya data tersebut terdistribusi homogen. Berdasarkan tabel *tukey test* menunjukkan tanda (*) pada angka *mean difference*, artinya hasil diameter hambat formula 1, formula 2, dan formula 3 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Analisis *homogeneous subtests* ini untuk mencari grup/substes mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *homogeneous* terbagi dalam 5 subtes, disimpulkan bahwa formula terbaik pada sediaan mutu konsentrasi ekstrak bunga sepatu 25% dengan perbandingan karbopol 2% karena nilai subset mendekati nilai kontrol positif. Hasil analisis uji *one way ANOVA* dapat dilihat pada lampiran 19.

Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara merusak sel bakteri, denaturasi protein, inaktivasi enzim dan menyebabkan lisis (Minasari *et al.* 2016). Alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel tersebut.

Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman. Tanin bersifat sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengerutkan dinding sel dan membran sel, inaktivasi enzim, dan inaktivasi fungsi materi genetik (Minasari *et al* 2016). Saponin memiliki aktivitas antibakteri dengan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen yang penting dalam sel bakteri. Saponin juga menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel.