

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Dalam konteks penelitian ini, populasi merujuk keseluruhan objek yang menjadi fokus studi. Populasi yang dipertimbangkan meliputi daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang diperoleh dari kawasan Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sementara itu, sampel merupakan subkelompok dari populasi yang dipilih untuk analisis, dengan karakteristik dan kehadiran yang diharapkan dapat mewakili atau menggambarkan sifat-sifat populasi secara keseluruhan. Dalam penelitian ini, sampel terdiri dari sediaan emulgel yang mengandung ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) dengan konsentrasi 10% serta terdapat penggunaan variasi konsentrasi HPMC yaitu 2%, 3%, dan 4%. Penggunaan berbagai konsentrasi HPMC bertujuan untuk mengevaluasi pengaruhnya terhadap sifat fisik emulgel yang dihasilkan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Fokus utama penelitian ini mencakup beberapa variabel kunci, yaitu ekstrak etanol yang diperoleh dari daun *Moringa oleifera* (daun kelor), formulasi emulgel yang mengintegrasikan ekstrak etanol tersebut, dan evaluasi terhadap karakteristik fisik serta kestabilan sediaan emulgel. Selain itu, penelitian ini menyelidiki dampak variasi konsentrasi *Hydroxy Propyl Methyl Cellulose* (HPMC) dalam formulasi emulgel, serta aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Elemen-elemen ini sangat penting dalam mengevaluasi efektivitas dan potensi aplikasi dari emulgel yang dikembangkan dalam kajian ini.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi sebelumnya dapat dikelompokkan ke dalam beberapa kategori, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas merujuk pada faktor yang dimodifikasi secara sengaja untuk mengevaluasi dampaknya terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebas adalah variasi konsentrasi HPMC.

Sebaliknya, variabel tergantung adalah hasil yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Dalam konteks penelitian ini, variabel tergantung mencakup kualitas fisik, stabilitas, dan aktivitas antibakteri emulgel ekstrak daun kelor terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Variabel terkendali, yang juga dikenal sebagai variabel kontrol, adalah faktor-faktor yang mempengaruhi variabel tergantung dan harus dinetralkan atau dikendalikan untuk memastikan hasil penelitian dapat direproduksi dengan akurasi oleh peneliti lain. Dalam studi ini, variabel terkendali mencakup metode ekstraksi daun kelor, karakteristik suspensi bakteri seperti konsentrasi dan volume suspensi, durasi penyimpanan emulgel, waktu inkubasi, kondisi laboratorium, serta identitas peneliti.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun kelor yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun segar dari *Moringa oleifera* L. yang diperoleh dari wilayah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak etanol dari daun kelor adalah bentuk ekstrak yang sangat kental, yang dihasilkan melalui proses maserasi serbuk daun kelor menggunakan pelarut etanol dengan konsentrasi 96%. Kemudian dilanjutkan dengan pemekatan menggunakan evaporator vakum, menghasilkan ekstrak pekat dari daun kelor.

Ketiga, evaluasi kualitas fisik mencakup pengamatan terhadap perubahan dalam sediaan emulgel ekstrak etanol daun kelor, termasuk bau, warna, dan bentuk. Selain itu, dilakukan pengujian organoleptik, homogenitas, daya lekat, daya sebar, stabilitas, pH, viskositas, serta tipe emulsi. Pengujian ini bertujuan untuk menilai konsistensi dan karakteristik fisik dari sediaan emulgel, yang penting untuk memastikan efektivitas dan keamanan produk.

Keempat, pengaruh variasi konsentrasi HPMC dievaluasi dengan mengamati sediaan emulgel ekstrak etanol melalui pembuatan kontrol yang melibatkan variasi konsentrasi HPMC. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bagaimana perbedaan konsentrasi HPMC memengaruhi sifat fisik dan performa emulgel, serta untuk menentukan konsentrasi optimal yang memberikan hasil terbaik dalam formulasi emulgel.

Kelima, bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus*, yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi dan telah melalui proses reaktivasi atau

penanaman ulang. Terakhir, evaluasi aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat, yaitu area bebas mikroorganisme yang mengelilingi sumuran yang mengandung sampel uji. Ukuran zona hambat ini dianggap sebagai indikasi kekuatan penghambatan terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

C. Alat dan Bahan

1. Alat penelitian

Dalam penelitian ini, berbagai peralatan digunakan untuk mendukung proses eksperimen, termasuk oven, penangas air, *drop plate*, dan *rotary evaporator*. Selain itu, penelitian ini juga memanfaatkan *moisture balance*, viskometer cup and bob, serta alat uji daya lekat untuk evaluasi karakteristik bahan. Objek glass dan kaca bulat digunakan untuk pengujian daya sebar, sementara tabung kaca, gelas beaker 100ml, dan gelas ukur 100ml memfasilitasi pengukuran volume, pipet tetes, cawan porselin, mortir dan stamper, serta sudip turut berperan dalam proses pengolahan sampel.

Peralatan analitis meliputi neraca analitik, wadah emulgel 100 gram, dan sendok spatula stainless steel autoklaf. Inkubator dan pipet mikro 1ml digunakan untuk inkubasi dan penimbangan presisi. Lampu spiritus, jarum ose, cawan petri steril, dan kapas lidi steril mendukung sterilisasi dan penanganan sampel dengan hati-hati. Mikroskop dan jangka sorong digunakan untuk observasi mikroskopik dan pengukuran akurat. Blender, kertas saring, keras perkamen, serta beban yang bervariasi (50 gram, 100 gram, dan 200 gram) menambah kemampuan penelitian dalam hal persiapan dan analisis sampel. *Stopwatch* dan kulkas berfungsi untuk pengendalian waktu dan penyimpanan sampel pada suhu yang tepat.

2. Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini, bahan-bahan yang digunakan meliputi daun kelor segar sebanyak 1 kg, etanol dengan konsentrasi 96% sebanyak 10 liter, serta beberapa bahan tambahan seperti HPMC, metil paraben, propil paraben, paraffin cair, propilenglikol, span 80, tween 80, aquadest, gel Medi-Klin 1%, asam asetat, asam asetat pekat, asam sulfat, asam sulfat pekat, FeCl₃, Methylen Blue, serta berbagai reagen seperti pereaksi Mayer, pereaksi Bauchardat, dan pereaksi Wagner. Selain itu, digunakan juga media pertumbuhan seperti *Brain Heart Infusion* (BHI), *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Vogel Johnson Agar* (VJA),

Kristal Violet untuk Gram A, larutan Lugol untuk Gram B, alkohol 70% untuk Gram C, dan safranin untuk Gram D. Penelitian ini juga melibatkan hidrogen peroksida 3%, plasma darah kelinci, asam sitrat, *Mueller Hinton Agar* (MHA), dan kalium telurit 1% sebagai bagian dari bahan percobaan. Penting untuk dicatat bahwa kombinasi bahan-bahan ini dirancang untuk mengevaluasi efektivitas serta interaksi mereka dalam konteks penelitian ini, yang bertujuan untuk memberikan pemahaman yang lebih mendalam mengenai sifat-sifat dan potensi aplikasi dari masing-masing komponen..

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Dalam penelitian ini, determinasi bertujuan memverifikasi keaslian simplisia yang dianalisis dengan memperhatikan aspek mikroskopis dan makroskopis, menggunakan referensi dari data pustaka sebagai acuan. Proses determinasi ini dilaksanakan di B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Melibatkan pemeriksaan menyeluruh terhadap karakteristik simplisia dilakukan dengan metodologi yang cermat untuk memastikan kesesuaiannya dengan standar identifikasi yang ditetapkan.

2. Pembuatan Serbuk Simplisia

Pengumpulan bahan dilakukan dengan mengumpulkan sekitar 12 kg daun kelor, yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Proses pembersihan dilakukan dengan mencuci daun kelor menggunakan aliran air bersih hingga seluruh kotoran hilang, lalu meniriskannya. Daun kelor dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di lingkungan terbuka, menghindari paparan langsung sinar matahari. Proses pengeringan dianggap selesai ketika daun menunjukkan perubahan warna yang memudar dan menjadi rapuh. Setelah kering, daun kelor digiling menggunakan blender untuk menghasilkan serbuk, yang kemudian diayak dengan mesh berukuran 60 dan ditimbang. Serbuk yang dihasilkan disimpan di tempat yang terlindung dari paparan sinar matahari untuk menjaga kualitasnya.

3. Penetapan Kadar Susut Pengeringan

Dalam penelitian ini, pengukuran kadar susut pengeringan meliputi evaluasi terhadap penurunan berat daun kelor serta ekstrak etanol yang diperoleh dari daun kelor. Sebanyak 2 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan aluminium yang memiliki kedalaman

dangkal, setelah sebelumnya dipanaskan pada suhu 105°C dan ditimbang. Ekstrak yang berada di dalam cawan tersebut kemudian diratakan secara merata dan ditempatkan dalam ruang pengering *moisture balance*. Setelah penutupan ruang pengering, proses pengeringan dilakukan pada suhu yang telah ditetapkan hingga alat tersebut secara otomatis menampilkan hasil akhir dari pengukuran (Depkes, 2000). Penelitian ini menggunakan metode yang terstandarisasi untuk memastikan akurasi dalam pengukuran kadar susut, melibatkan penyesuaian suhu dan teknik penimbangan yang presisi. Prosedur ini bertujuan mengurangi variabilitas dalam hasil pengukuran dan meningkatkan reliabilitas data yang diperoleh.

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelor

Dalam penelitian ini, pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan teknik maserasi. Sebanyak 1 kg serbuk daun kelor dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap dan dicampur dengan 10 liter pelarut etanol 96% dengan rasio 1:10. Campuran ini kemudian direndam selama 6 jam dengan pengadukan berkala, diikuti dengan periode diam selama 18 jam. Proses pemisahan maserat dilakukan melalui penyaringan. Penyaringan diulang menggunakan pelarut yang sama, dengan volume pelarut setengah dari jumlah yang digunakan pada penyaringan pertama. Maserat yang terpisah dikumpulkan dan dikonsentrasikan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 65°C (Farmakope Herbal Indonesia, 2011).

Teknik maserasi memungkinkan ekstraksi zat aktif dari daun kelor secara efisien. Penggunaan botol gelap bertujuan melindungi pelarut dari paparan cahaya dapat mengurangi efektivitas ekstraksi. Proses pengadukan secara berkala selama tahap rendam berfungsi meningkatkan interaksi antara bahan dan pelarut, sedangkan waktu diam yang lebih lama memberikan kesempatan bagi pelarut untuk sepenuhnya menyerap zat aktif. Prosedur penyaringan berulang memastikan bahwa semua komponen terlarut dapat diekstraksi, sementara pemekatan pada *rotary evaporator* membantu mengurangi volume pelarut untuk memperoleh konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi.

5. Uji Bebas Etanol

Uji keberadaan etanol dilakukan melalui proses esterifikasi alkohol. Dalam metode ini, ekstrak daun kelor dicampur dengan asam asetat dan asam sulfat pekat, lalu dipanaskan. Jika tidak terdeteksi

adanya bau khas ester selama proses pemanasan, menunjukkan bahwa etanol tidak lagi terdapat dalam ekstrak daun kelor. Prosedur ini memungkinkan penilaian efektif terhadap keberadaan etanol dengan memanfaatkan reaksi kimia yang menghasilkan bau ester sebagai indikator.

6. Skrining Fitokimia

Setelah ekstrak daun kelor yang kental diperoleh, dilakukan pengujian fitokimia yang mencakup analisis flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan triterpenoid. Pengujian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa-senyawa aktif memiliki potensi biologis atau terapeutik. Evaluasi fitokimia ini penting untuk memahami komposisi kimia ekstrak daun kelor dan memvalidasi keberadaan berbagai metabolit sekunder yang berpotensi memberikan efek farmakologis.

6.1 Identifikasi Flavonoid. Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan sejumlah kecil serbuk magnesium serta empat tetes larutan HCl 2%. Keberadaan flavonoid diidentifikasi melalui perubahan warna yang muncul, yang dapat berupa merah, kuning, atau jingga (Afifah, 2020). Warna-warna ini merupakan indikasi reaksi spesifik flavonoid dengan magnesium dan HCl, mencerminkan adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak.

6.2 Identifikasi Alkaloid. Ekstrak daun kelor ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan HCl 2N dan aquadest. Dilanjutkan dengan pemanasan selama dua menit, setelah itu campuran didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian dibagi ke dalam tiga tabung reaksi dengan volume masing-masing 1 ml. Setiap tabung reaksi diberi dua tetes reagen Mayer, Dragendorff, dan Wagner. Kehadiran alkaloid akan terdeteksi sebagai endapan putih dengan reagen Mayer, endapan merah jingga dengan reagen Dragendorff, dan endapan coklat dengan reagen Wagner (Muthamainah, 2017). Untuk mengidentifikasi alkaloid secara lebih mendalam, reaksi ini memanfaatkan perbedaan warna endapan yang terbentuk sebagai indikator spesifik. Endapan putih yang dihasilkan dengan reagen Mayer mengindikasikan adanya alkaloid tertentu, sementara endapan merah jingga yang dihasilkan oleh reagen Dragendorff serta endapan coklat dari reagen Wagner memberikan informasi tambahan mengenai tipe alkaloid yang mungkin ada dalam

ekstrak daun kelor. Proses ini memberikan wawasan penting mengenai komposisi kimia dari ekstrak tersebut.

6.3 Identifikasi Tannin. Ekstrak ditambahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian disusul dengan penambahan 1-2 tetes larutan peraksi besi (FeCl_3) 1%. Kehadiran tannin dalam ekstrak dapat diidentifikasi melalui pembentukan warna kebiruan atau hijau, yang mengindikasikan adanya reaksi kimia dengan peraksi tersebut (Noer, 2016). Proses ini memberikan indikasi kualitatif terhadap konsentrasi tannin, yang sering kali digunakan sebagai indikator dalam analisis senyawa fenolik pada bahan penelitian

6.4 Identifikasi Saponin. Ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diberi perlakuan dengan penambahan air panas. Setelah proses pemanasan, campuran didinginkan dan dikocok dengan intensitas tinggi selama 10 detik untuk memastikan homogenitas. Proses berikutnya mencakup pengamatan terhadap perubahan yang terjadi dalam campuran tersebut. Selanjutnya, ditambahkan satu tetes larutan HCl 2N, dan dilakukan pengamatan lanjutan untuk mengevaluasi efek tambahan. Identifikasi keberadaan saponin dapat dilakukan berdasarkan pembentukan busa yang stabil selama 10 menit, yang menunjukkan adanya saponin dalam ekstrak tersebut (Muthamainah, 2017).

6.5 Identifikasi Steroid dan Triterpenoid. Ekstrak diletakkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan tiga tetes asam asetat anhidrat dan diaduk secara perlahan hingga larutan mengering. Setelah itu, dua tetes asam sulfat pekat ditambahkan. Kehadiran steroid akan diindikasikan dengan munculnya warna biru, sedangkan triterpenoid akan terdeteksi melalui perubahan warna menjadi merah jingga, kecoklatan, atau violet (Tukiran, 2020).

7. Sterilitas

Sterilisasi merupakan suatu tahapan kritis dalam upaya mengeliminasi atau menonaktifkan mikroorganisme dari perangkat dan media yang akan digunakan dalam proses penelitian. Semua peralatan yang akan digunakan, seperti gelas ukur, tabung reaksi, dan erlenmeyer, terlebih dahulu dicuci dengan teliti, kemudian dikeringkan dan disterilisasi untuk memastikan kebersihannya. Peralatan ini kemudian ditutup menggunakan kapas untuk mencegah kontaminasi lebih lanjut. Cawan petri dibungkus menggunakan kertas koran, sedangkan media pembenihan disterilisasi melalui autoklaf pada suhu

121°C selama 15 menit di bawah tekanan 1 atmosfer guna menjamin efektivitas proses sterilisasi. Jarum ose disterilkan secara khusus dengan menggunakan nyala api bunsen, yang merupakan metode efisien untuk mencapai sterilisasi sempurna pada alat-alat yang lebih kecil.

8. Pembuatan Stok dan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sampel bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta. Proses aktivasi bakteri ini dimulai dengan kultivasi menggunakan media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang sebelumnya telah dilarutkan dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, sebanyak 5 ml media BHI steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sebuah ose biakan murni *Staphylococcus aureus* kemudian diinokulasi ke dalam media tersebut dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator, menghasilkan kultur bakteri yang dijadikan stok. Proses selanjutnya adalah pembuatan suspensi bakteri, di mana satu ose koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari stok dipindahkan ke dalam tabung reaksi berisi media BHI steril, lalu diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C. Kekekutan suspensi bakteri ini disesuaikan dengan standar MacFarland 0,5 melalui proses pengenceran menggunakan larutan NaCl fisiologis steril, menghasilkan suspensi dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml. Media BHI-B dipilih karena mengandung karbohidrat dan protein dalam jumlah tinggi, yang sangat mendukung pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, sebagaimana diungkapkan dalam penelitian oleh Indrayati dan Akma (2018).

9. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

9.1 Uji media selektif. *Vogel Johnson Agar* (VJA) merupakan medium pertumbuhan yang diperkaya dengan zat kimia tertentu yang berfungsi untuk mendukung proliferasi bakteri *Staphylococcus aureus*. Dalam pengujian ini, suspensi *Staphylococcus aureus* diinokulasikan melalui pada media VJA yang telah ditambahkan dengan 3 tetes larutan kalium telurit 1% ke dalam cawan petri. Media tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan pembentukan koloni hitam, disertai perubahan warna medium di sekitar koloni menjadi kuning (Jawetz *et al.*, 2007). Prosedur ini menggambarkan interaksi kompleks antara komponen kimia dalam media dan metabolisme bakteri, yang menghasilkan

perubahan warna sebagai penanda pertumbuhan bakteri yang khas. Hal ini menunjukkan bahwa komposisi kimia dalam media dapat secara spesifik mempengaruhi respons metabolik bakteri, menghasilkan visualisasi perubahan warna yang menjadi indikator vital bagi keberhasilan kultur.

9.2 Uji Mikrobiologi dan pewarnaan gram. Dalam prosedur pewarnaan Gram, preparat dilakukan dengan cara mengambil sampel satu ose koloni bakteri, kemudian dikeringkan dan difiksasi dengan menggunakan lampu bunsen. Setelah preparat mengering, dioleskan Kristal Violet (Gram A) sebanyak 2-3 tetes sebagai pewarna primer, hingga seluruh area preparat terwarnai. Pewarna ini dibiarkan selama sekitar 1 menit. Setelah itu, preparat dicuci dengan aquades yang mengalir, lalu ditetesi dengan larutan Lugol (Gram B), dibiarkan selama kurang lebih 1 menit, dan dicuci kembali dengan air mengalir sebelum dikeringkan. Selanjutnya, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol 70%) selama sekitar 30 detik, kemudian diwarnai dengan safranin (Gram D) dan dibiarkan selama 2 menit. Setelah proses pewarnaan selesai, preparat dicuci dengan aquades mengalir dan dikeringkan. Hasil pewarnaan diamati menggunakan mikroskop. *Staphylococcus aureus* dapat dikenali dari morfologi sel bakteri yang berbentuk bulat (coccus) dan tersusun dalam kelompok seperti anggur, dengan warna ungu yang khas.

9.3 Uji katalase. Pengujian katalase dilaksanakan dengan tujuan untuk mengidentifikasi keberadaan enzim sitokrom oksidase. Prosedur ini mencakup penambahan dua tetes larutan hidrogen peroksida 3% ke permukaan objek kaca yang telah dipersiapkan. Selanjutnya, kultur bakteri diterapkan pada kaca yang telah diberi tetesan hidrogen peroksida tersebut. Reaksi positif dapat dideteksi melalui terbentuknya gelembung, yang menunjukkan adanya evolusi gas oksigen (Jawetz *et al.*, 2007). Proses ini memberikan indikasi bahwa enzim katalase hadir dalam sampel bakteri yang diuji.

9.4 Uji koagulase. Pengujian koagulase bertujuan untuk mengidentifikasi adanya koagulase bebas yang tidak terikat. Prosedur ini melibatkan pencampuran sebanyak 200 µl plasma darah manusia atau kelinci dengan larutan asam sitrat yang telah diencerkan dalam rasio 1:5. Setelah itu, satu ose kultur bakteri *Staphylococcus aureus* ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Selanjutnya, campuran ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Penilaian hasil dilakukan

dengan mengamati terbentuknya gumpalan setelah periode inkubasi minimal empat jam. Hasil yang dikategorikan sebagai positif ditunjukkan dengan ketidakmampuan pemisahan gumpalan plasma dari dinding tabung saat tabung dibalik, yang mengindikasikan bahwa gumpalan tetap melekat secara konsisten pada dinding tabung (Jawetz *et al.*, 2007). Dalam prosedur ini, pembentukan gumpalan menunjukkan adanya aktivitas koagulasi yang mengindikasikan infeksi oleh *Staphylococcus aureus*. Proses ini penting untuk menegaskan diagnosis infeksi berbasis koagulasi dan untuk mengevaluasi respons imun tubuh terhadap patogen tersebut.

10. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kelor

Aktivitas antimikroba dievaluasi menggunakan metode sumuran pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Pada prosedur ini, bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi secara merata pada permukaan agar dengan pola zig-zag, sehingga mencakup seluruh permukaan media. Setelah proses inokulasi selesai, sumur-sumur kecil dibuat pada media yang telah terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Selanjutnya, ekstrak daun kelor yang telah diencerkan dalam DMSO dimasukkan ke dalam sumur-sumur yang telah dibuat. Ekstrak yang diuji meliputi ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 5%, ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 10% ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 15%, serta DMSO sebagai kontrol negatif dan ekstrak daun kelor sebagai kontrol positif. Pengujian dilakukan dalam tiga kali pengulangan untuk memastikan konsistensi hasil. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong, data yang diperoleh dianalisis secara statistik untuk menilai aktivitas antimikroba dari ekstrak yang diuji.

11. Pembuatan Emulgel Ekstrak Etanol Daun Kelor

Dalam kajian Djumaati (2018), telah dilakukan penilaian terhadap aktivitas antibakteri ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang diformulasikan dalam bentuk salep terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada konsentrasi 10%, salep ini menunjukkan diameter zona hambat sebesar 18,6 mm. Selain itu, pemilihan konsentrasi HPMC sebagai agen pengental merujuk pada penelitian Setyaningrum (2013), yang mengungkapkan bahwa konsentrasi HPMC sebesar 13%, 15%, dan 17% dapat meningkatkan viskositas serta adhesi gel. Penggunaan konsentrasi HPMC lebih tinggi cenderung

mengakibatkan penurunan dalam kemampuan penyebaran serta efektivitas antibakteri dari salep tersebut.

Tabel 3. Tabel formula emulgel ekstrak daun kelor (Daud dan Suryanti, 2017)

Nama Bahan	Komposisi (%)						Kegunaan
	F1	F2	F3	K1	K2	K3	
Ekstrak daun kelor	10	10	10	0	0	0	Zat aktif
HPMC	2	3	4	2	3	4	<i>Gelling Agent</i>
Paraffin cair	5	5	5	5	5	5	Emolien
Span 80	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	Pengemulsi
Tween 80	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08	Pengemulsi
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	Pengawet
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	Pengawet
Propilenglikol	10	10	10	10	10	10	Humektan
Aquadest hingga	100	100	100	100	100	100	Pelarut

Emulgel dirancang dengan enam variasi formula, di mana pengembangan formula dilakukan dengan memanfaatkan HPMC hingga mencapai hasil yang optimal. Variasi konsentrasi HPMC yang digunakan setelah orientasi adalah 2%, 3%, dan 4%, masing-masing untuk sediaan 100 gram, dengan tiga formulasi mengandung ekstrak etanol daun kelor dan tiga formulasi tanpa ekstrak. Semua bahan yang diperlukan dipersiapkan dengan menimbang sesuai formulasi. Basis gel HPMC dibuat dengan cara menambahkan HPMC secara bertahap ke dalam air panas pada suhu 80°C, kemudian didiamkan selama 30 menit hingga HPMC mengembang, selanjutnya digerus hingga terbentuk basis gel. Massa emulsi disiapkan dengan memanaskan fase minyak (parafin cair, span 80, dan tween 80) pada suhu 70°C. Secara bersamaan, fase air (metil paraben dan propil paraben bersama propilenglikol) juga dipanaskan. Setelah kedua fase panas, keduanya dicampurkan dan digerus hingga membentuk emulsi, kemudian dicampurkan dengan basis gel hingga homogen. Ekstrak daun kelor digerus dalam mortir panas hingga mencair, kemudian dimasukkan ke dalam mortir berisi emulgel dan diaduk hingga tercampur merata. Prosedur ini diulang sebanyak tiga kali untuk masing-masing formula, termasuk formulasi dan sediaan emulgel kontrol tanpa ekstrak daun kelor.

12. Evaluasi Fisik dan Uji Stabilitas Sediaan

Penilaian atau evaluasi fisik terhadap sediaan bertujuan untuk menentukan sejauh mana emulgel daun kelor memenuhi kriteria tertentu, antara lain:

12.1 Uji Organoleptik. Uji organoleptik dilakukan dengan memeriksa berbagai perubahan fisik yang terjadi pada sediaan, termasuk perubahan warna, bentuk, aroma, serta homogenitas. Proses ini melibatkan pengamatan mendetail terhadap karakteristik sensori sediaan, guna memastikan bahwa tidak terjadi penyimpangan yang signifikan dari spesifikasi yang diharapkan.

12.2 Uji Homogenitas. Uji homogenitas yang dilakukan pada semua konsentrasi menunjukkan bahwa tidak terdapat ketidaksempurnaan dalam pencampuran warna maupun keberadaan butiran kasar yang belum sepenuhnya terdispersi dalam sediaan emulgel daun kelor. Sebanyak 0,1 gram emulgel diletakkan pada objek kaca dan diratakan, kemudian diamati untuk memastikan adanya keseragaman warna dan ketiadaan butiran yang tidak terdistribusi secara merata dalam sediaan tersebut. Pengamatan ini bertujuan untuk menilai konsistensi dan kualitas fisik dari emulgel yang dihasilkan.

12.3 Uji pH. Untuk menilai pH pada sediaan emulgel daun kelor, digunakan kertas pH universal. Prosedur pengujian pH melibatkan perendaman kertas pH universal ke dalam sediaan emulgel, diikuti dengan pengamatan terhadap nilai pH yang diperoleh. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali sebagai upaya untuk memastikan konsistensi dan keakuratan hasil.

12.4 Uji Tipe Emulsi. Uji terhadap jenis emulsi dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran dan pewarnaan untuk mengidentifikasi tipe emulsi yang diinginkan, yakni emulsi minyak dalam air (M/A). Proses pewarnaan melibatkan penerapan zat pewarna yang larut dalam air, yaitu *Metylen Blue*. Metode pewarnaan dilakukan dengan 1 gram emulgel diteteskan pewarna Metylen Blue kemudian dicampurkan, kemudian dilakukan pengamatan untuk memastikan ada atau tidaknya pemisahan antara fase air dan minyak. Pada fase pengenceran, 1 gram emulgel dilarutkan dalam 5 ml air, kemudian dilakukan pengamatan untuk memastikan apakah emulgel tersebut dapat membentuk campuran yang homogen dengan air. Apabila campuran tersebut menunjukkan kemampuan larut yang memadai, maka dapat disimpulkan bahwa emulsi yang terbentuk adalah jenis minyak dalam air (M/A). Dilakukan secara berulang sebanyak tiga kali untuk memastikan konsistensi hasil melalui replikasi yang sistematis.

12.5 Uji Viskositas. Pengujian viskositas dilakukan menggunakan perangkat viskometer tipe cup and bob. Prosedur ini

melibatkan memasukkan 100 gram emulgel ke dalam wadah, kemudian memasang spindel No. 7. Alat dioperasikan pada kecepatan 50 rpm (putaran per menit). Nilai viskositas ditentukan berdasarkan skala jarum yang berhenti pada posisi tetap, kemudian dicatat. Proses ini diulang sebanyak tiga kali untuk memperoleh replikasi. Hasil pengukuran yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan metode statistik untuk memperoleh interpretasi yang lebih akurat.

12.6 Uji Daya Sebar. Sebanyak 0,5 gram sampel bahan diujikan dengan menempatkannya secara terpusat pada kaca bulat berskala. Kaca bulat diberi pemberat dengan variasi massa 50 gram, 100 gram, 150 gram, dan 200 gram, yang secara bertahap ditempatkan di atas emulgel. Setelah penempatan pemberat, sampel dibiarkan berada dalam kondisi diam selama satu menit sebelum dilakukan pengukuran terhadap diameter penyebarannya. Prosedur ini diulang sebanyak tiga kali guna memastikan konsistensi replikasi hasil yang diperoleh. Selanjutnya, data yang terkumpul dianalisis menggunakan pendekatan statistik untuk mengidentifikasi pola serta signifikansi dari hasil yang diperoleh.

12.7 Uji Daya Lekat. Pengujian terhadap adhesi emulgel yang mengandung ekstrak daun kelor dilakukan dengan memanfaatkan perangkat khusus untuk mengukur daya lekatnya. Sebanyak 0,5 gram sediaan emulgel ditimbang secara presisi dan diaplikasikan secara seragam pada permukaan objek gelas pertama, yang kemudian ditindih dengan objek gelas kedua. Kedua objek gelas ini kemudian diberi beban sebesar 1 kg selama durasi 5 menit. Setelah itu, tuas pada perangkat ditarik, pengukuran waktu dimulai dari penarikan tuas hingga kedua objek gelas terpisah. Diulang sebanyak tiga kali untuk memperoleh data replikasi yang valid. Hasil dari pengujian ini kemudian dianalisis secara statistik untuk menilai konsistensi serta efektivitas adhesi dari emulgel yang dihasilkan, yang merupakan parameter kunci dalam evaluasi kualitas sediaan tersebut.

12.8 Uji Stabilitas. Penelitian mengenai stabilitas emulgel telah dilaksanakan melalui metode *cycling test*, di mana emulgel disimpan pada suhu rendah, yakni 4°C di dalam pendingin selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke oven bersuhu 40°C untuk durasi 24 jam, yang dianggap sebagai satu siklus. Proses pengujian ini dilakukan secara berkelanjutan selama enam siklus. Selama penelitian, perhatian diarahkan pada perubahan fisik, termasuk parameter organoleptik

(seperti aroma, warna, dan bentuk fisik), jenis emulsi, keseragaman, serta pH sediaan. Prosedur ini diulang sebanyak tiga kali replikasi untuk memastikan konsistensi hasil yang diperoleh. Data yang berkaitan dengan pH dan karakteristik lainnya kemudian dianalisis menggunakan teknik statistik yang sesuai untuk menjamin validitas temuan.

13. Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Emulgel

Penggunaan *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebagai media kultur bakteri menawarkan sejumlah keuntungan karena sifatnya non-selektif dan non-differensial, sehingga memungkinkan pertumbuhan berbagai jenis bakteri (Atmojo, 2016). Metode difusi sumuran diterapkan pada cawan petri steril yang telah dipersiapkan dengan media MHA, di mana lubang sumuran dibuat sebagai bagian dari prosedur. Dimulai dengan pengambilan inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* dari media *Brain Heart Infusion* (BHI), yang telah distandarisasi pada kekeruhan McFarland 0,5 menggunakan kapas steril. Inokulasi bakteri kemudian dilakukan pada media MHA dan dibiarkan selama 10 menit untuk memungkinkan difusi suspensi bakteri ke dalam media. Pada cawan petri pertama, dilakukan penambahan sediaan emulgel ekstrak etanol daun kelor serta kontrol positif. Sebaliknya, cawan petri kedua digunakan untuk kontrol basis. Pada cawan petri pertama, sumur A diisi dengan emulgel ekstrak daun kelor F1 sebanyak 0,1 gram menggunakan sendok besi, sumur B diisi dengan emulgel ekstrak daun kelor F2 sebanyak 0,1 gram menggunakan kaca arloji, dan sumur C diisi dengan emulgel ekstrak daun kelor F3 sebanyak 0,1 gram juga menggunakan kaca arloji. Sumur kontrol positif (+) diisi dengan antibiotik Medi-Klin Gel 1% sebanyak 0,1 gram, yang dimasukkan menggunakan spuit kaca arloji. Cawan petri pada sumur D diisi dengan kontrol K1 sebanyak 0,1 gram menggunakan kaca arloji, sementara sumur E diisi dengan kontrol K2 dengan jumlah yang sama dan cara yang serupa. Demikian juga, sumur F diisi dengan kontrol K3 sebanyak 0,1 gram menggunakan kaca arloji. Seluruh cawan petri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Penilaian terhadap zona yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri di sekitar sumuran menunjukkan bahwa bahan uji memiliki potensi penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri. Pengujian ini dilakukan dalam tiga replikasi untuk memastikan konsistensi hasil. Diameter zona hambat diukur dan data yang diperoleh dianalisis menggunakan metode

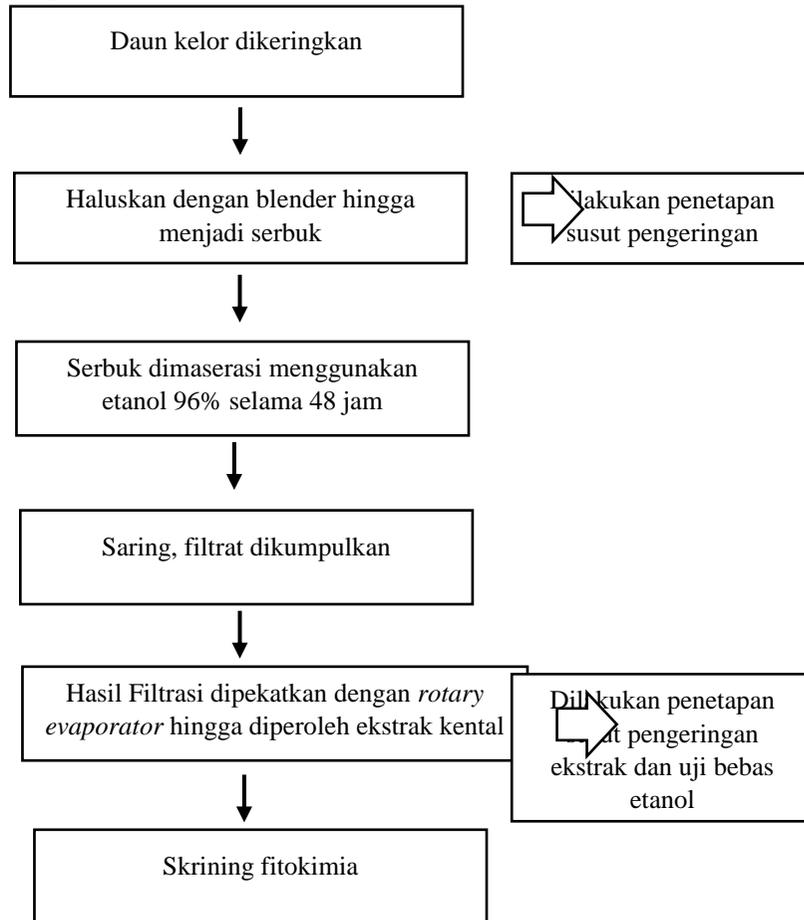
statistik. Kontrol positif yang digunakan adalah Medi-Klin Gel 1%, yang mengandung klindamisin, sebuah agen anti jerawat yang dikenal efektif. Klindamisin, sebagai antibiotik lincosamide, bekerja dengan mengikat subunit ribosom 50S dan menghambat sintesis protein melalui gangguan aktivitas tRNA selama proses translasi (National Library of Medicine, 2013).

E. Analisis Hasil

Data yang dikumpulkan meliputi viskositas, daya sebar, daya lekat, dan pH. Untuk memulai analisis, dilakukan pemeriksaan awal terhadap distribusi data menggunakan uji Shapiro-Wilk. Apabila uji ini menunjukkan distribusi normal ($p > 0,05$), maka analisis selanjutnya menggunakan uji parametrik One Way ANOVA. Namun, apabila data tidak mengikuti distribusi normal ($p < 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji non-parametrik Kruskal-Wallis. Aktivitas antibakteri, yang diukur melalui zona hambat, juga dianalisis dengan uji Shapiro-Wilk untuk menentukan pola distribusi data. Jika data menunjukkan distribusi normal ($p > 0,05$), maka analisis dilakukan dengan uji parametrik One Way ANOVA. Sebaliknya, jika data tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$), uji Duncan diterapkan untuk mengevaluasi perbedaan signifikan di antara kelompok-kelompok yang dianalisis. Penentuan metode analisis ini penting untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh akurat dan valid sesuai dengan distribusi data yang ada.

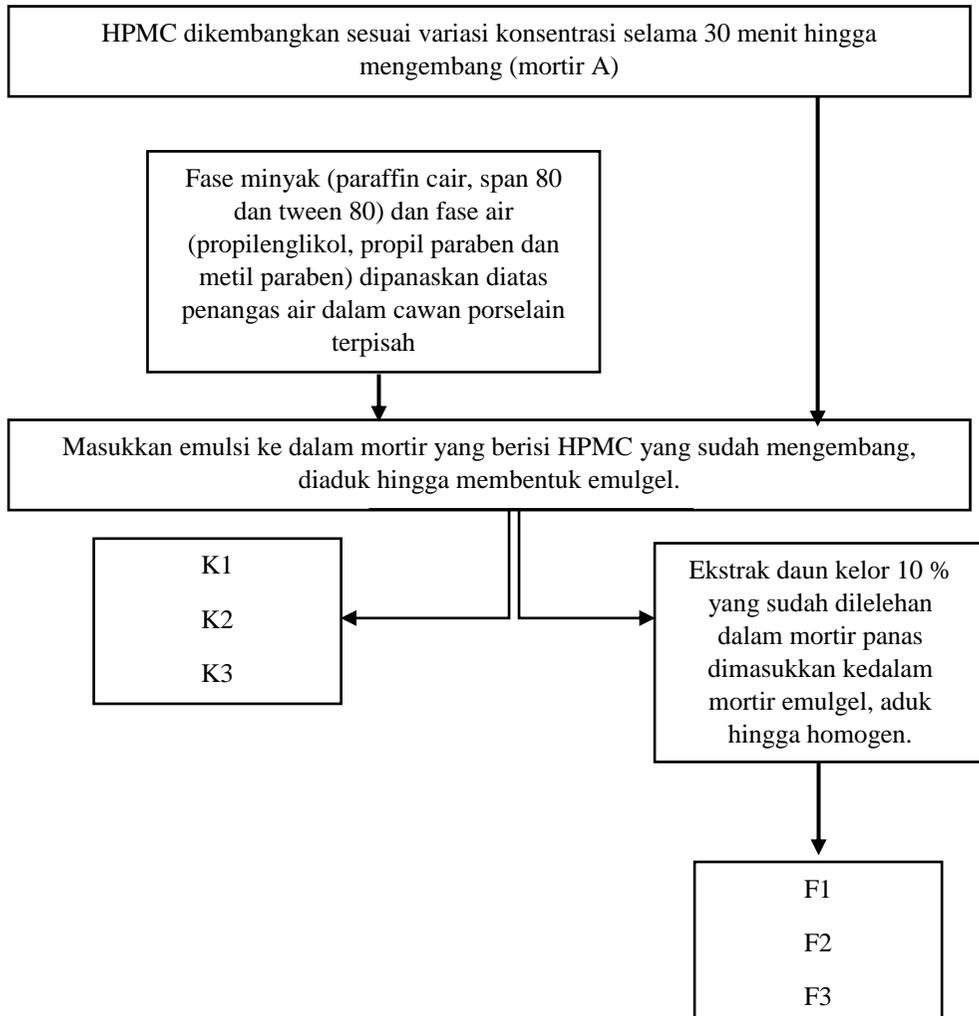
F. Skema Penelitian

1. Skema pembuatan ekstrak daun kelor



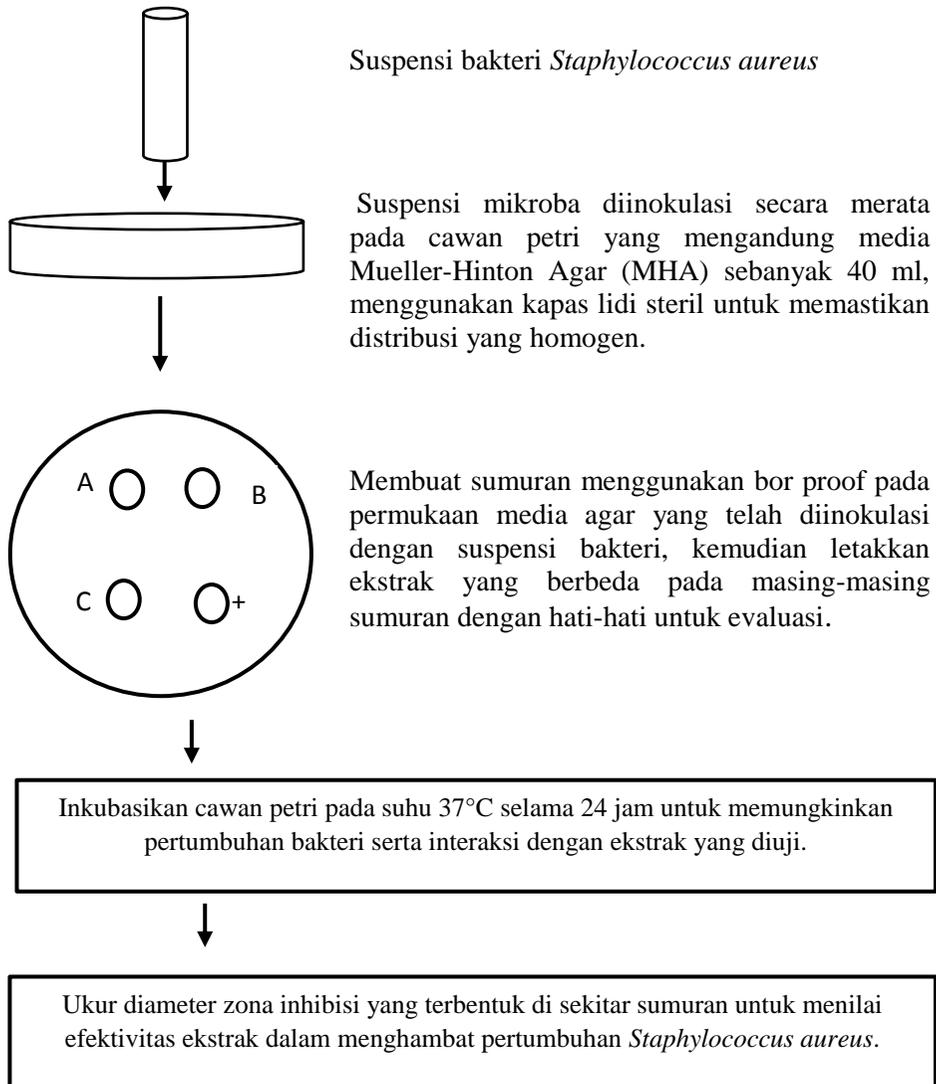
Gambar 10. Skema pembuatan ekstrak daun kelor

2. Skema pembuatan emulgel ekstrak etanol daun kelor



Gambar 11. Skema pembuatan emulgel ekstrak daun kelor

3. Uji aktivitas ekstrak etanol daun kelor

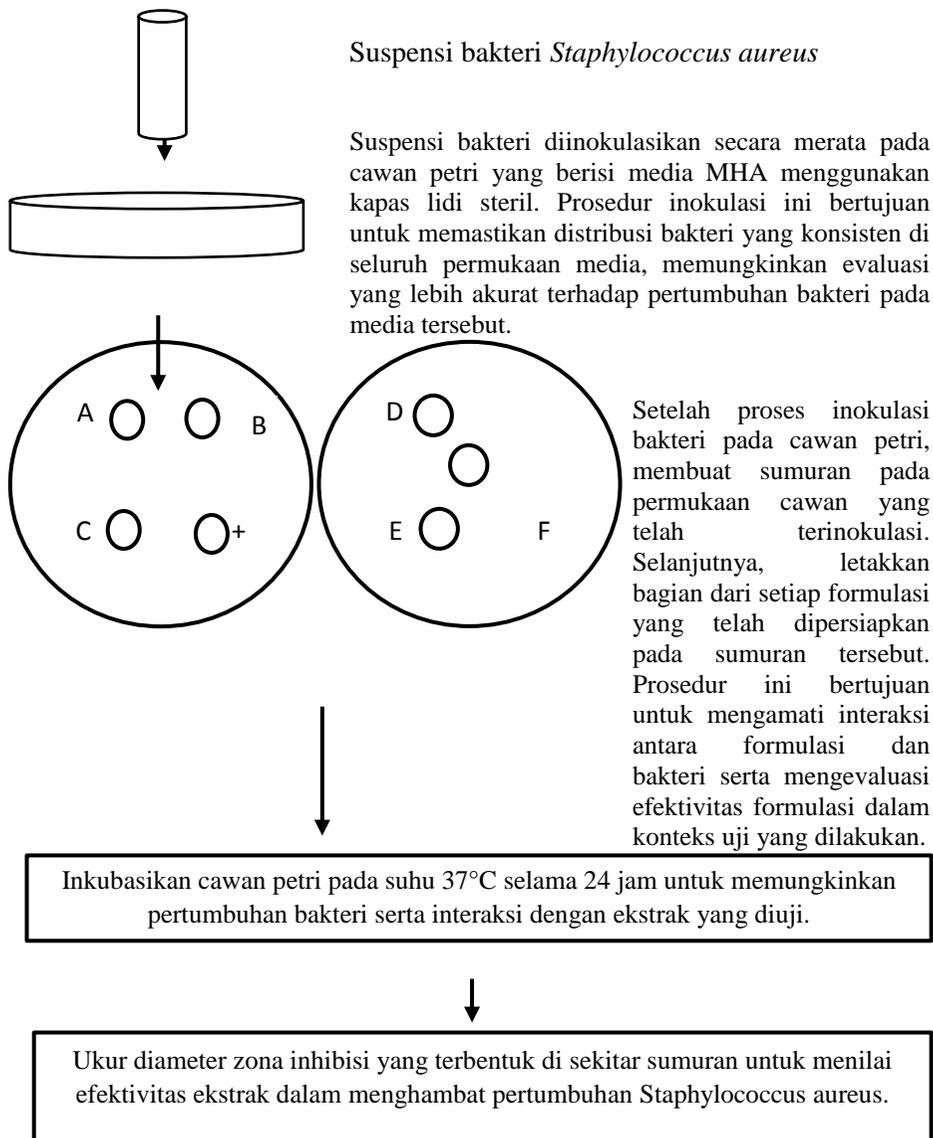


Gambar 12. Skema pengujian aktivitas antibakteri

Keterangan :

- A Sampel ekstrak etanol daun kelor 5% sebanyak 0,1 gram
- B Sampel ekstrak etanol daun kelor 5% sebanyak 0,1 gram
- C Sampel ekstrak etanol daun kelor 5% sebanyak 0,1 gram
- Kontrol negatif berisi DMSO

4. Uji aktivitas emulgel ekstrak etanol



Gambar 13. Rancangan uji untuk menilai aktivitas antibakteri dari emulgel yang mengandung ekstrak etanol dari daun kelor

Keterangan :

- A Sampel emulgel K1 sebanyak 0,1 gram (kontrol negatif)
- B Sampel emulgel K2 sebanyak 0,1 gram (kontrol negatif)
- C Sampel emulgel K3 sebanyak 0,1 gram (kontrol negatif)
- D Sampel emulgel ekstrak daun kelor F1 sebanyak 0,1 gram
- E Sampel emulgel ekstrak daun kelor F2 sebanyak 0,1 gram
- F Sampel emulgel ekstrak daun kelor F3 sebanyak 0,1 gram
- + Kontrol positif antibiotik Medi-Klin Gel 1 %