

SKRIPSI

HANIK MARIANA DEWI

UJI EFEKTIVITAS ANTIMIKROBA SEDIAAN PENCERAH

***VANISHING CREAM* DENGAN BAHAN AKTIF**

TAMARINDUS INDICA L



FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2004

LEMBAR PENGESAHAN

UJI EFEKTIVITAS ANTIMIKROBA SEDIAAN PENCERAH
***VANISHING CREAM* DENGAN BAHAN AKTIF**
TAMARINDUS INDICA L

SKRIPSI

Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2004

Oleh :

HANIK MARIANA DEWI
NIM. 050012285

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

Dr. Widji Soeratri, DEA.,Apt
NIP. 130611501

Dr. Isnaeni, MS.,Apt.
NIP. 131976937

RINGKASAN

Penelitian yang telah dilakukan bertujuan untuk membuat formulasi ekstrak *Tamarindus indica L* sebagai sediaan pencerah kulit dan diukur efektivitasnya terhadap mikroorganisme. Penelitian ini didasari oleh keinginan penulis untuk menyediakan suatu pilihan produk sediaan pencerah kulit yang berasal dari alam tanpa menggunakan bahan pengawet sintetis yang ditambahkan dalam sediaan. Menurut literatur, *Tamarindus indica L* mempunyai khasiat sebagai bahan pencerah kulit karena kandungan AHA didalamnya, selain itu juga mempunyai aktivitas kuat sebagai antimikroba.

Uji efektivitas antimikroba sediaan pencerah *vanishing cream Tamarindus indica L*, dilakukan dengan penambahan inokulum *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* pada sediaan dengan bahan aktif ekstrak *Tamarindus indica L* dengan berbagai konsentrasi AHA yang efektif dan aman sebagai pencerah kulit.

Penilaian efektivitas antimikroba sediaan pencerah kulit dilakukan dengan mengamati pertumbuhan koloni mikroba uji pada hari ke-1, 7, 14, 21 dan 28 setelah inokulasi. Menurut Farmakope Indonesia IV, suatu pengawet dinyatakan efektif di dalam sediaan uji jika jumlah bakteri viabel pada hari ke-14 berkurang hingga tidak lebih dari 0,1% dari jumlah awal pertumbuhan dan jumlah tiap mikroba uji selama hari ke-28 adalah tetap.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tidak ada pertumbuhan sama sekali pada sediaan uji yang telah diinokulasi dengan bakteri, tetapi terdapat pertumbuhan *Candida albicans* pada hari ke-1. Pengamatan hari ke-7 pada *Candida albicans* didapat penurunan jumlah mikroba yang bermakna pada sampel dengan konsentrasi asam tartrat 6% dan 7%, tetapi tidak ada penurunan yang bermakna pada konsentrasi asam tartrat 5%. Pada pengamatan hari ke 14, sudah tidak ada pertumbuhan sama sekali pada konsentrasi asam tartrat 7% dan terdapat sedikit pertumbuhan pada konsentrasi 6%. Pertumbuhan yang terjadi pada konsentrasi asam tartrat 6% di hari ke-14 masih lebih dari 0,1 % sehingga belum memenuhi syarat Farmakope Indonesia IV. Berdasarkan hal tersebut maka hanya dipilih konsentrasi asam tartrat 7% untuk diformulasi dalam basis *vanishing cream*. Dari hasil pengamatan didapat pertumbuhan *Candida albicans* pada hari pertama lebih sedikit yaitu $55,33 \times 10^3$ dibanding dengan pertumbuhan jamur pada sampel tanpa basis *vanishing cream* yaitu 87×10^3 , hal ini terjadi karena jumlah fase air pada basis lebih sedikit dibandingkan kontrol. Seperti diketahui bahwa antimikroba diperlukan untuk penjagaan pertumbuhan mikroba pada fase air saja, sehingga dengan jumlah air yang sedikit dan dengan jumlah ekstrak yang sama dapat memberi daya antimikroba lebih kuat.

Dari data tersebut selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan uji *Anova Faktorial* pada $P(0,05)$ untuk mengetahui apakah terjadi perbedaan pertumbuhan koloni yang bermakna.

Dari hasil pengamatan pertumbuhan *Candida albicans* dalam sediaan pencerah *vanishing cream Tamarindus indica L* yang mengandung asam tartrat 7% ada perbedaan bermakna pada pertumbuhan koloni pada hari ke-1 dan ke-7, selanjutnya tidak ada perbedaan bermakna pada hari ke-7 sampai hari ke-28. Hal ini berarti bahwa antimikroba yang ada dalam ekstrak *Tamarindus indica L* yang mengandung asam tartrat 7% mampu memberi penjagaan terhadap pertumbuhan *Candida albicans* selama 28 hari penyimpanan.

ABSTRACT

The Effectivity of antimicrobial agent in Tamarind Extract as Skin Lightening in Vanishing Cream Base

The observation has purpose to know the effectivity antimicrobial agent of Tamarind extract formulated in vanishing cream base at the different concentration wich is effective in skin lightening

To know the effectivity of both, experiment was done with infected sample with *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *escherichia coli* and *Candida albican*. The assessment of the effectivity was done with visually watching the growth of colony compared with the control sample. Watching is done at 1st day, 7th day, 14th day, 21th day and 28th day after infected the samples.

Statistic analyze result with *anova factorial* test in P (0,05) shows that there are significant differences growth of colony 1st day from 7th day in sample with concentration 7%

Keyword : *Tamarindus indica L*, Tamarind extract, skin lightening, *Tamarindineal*, antimicrobial agent

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
RINGKASAN.....	v
ABSTRAK.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Hipotesis.....	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Tinjauan Tentang Kulit.....	5
2.1.1. Tinjauan Umum	5
2.1.2. Anatomi dan Fisiologi Kulit.....	5
2.2. Kosmetika Pencerah	7
2.2.1. Tinjauan Umum.....	7
2.2.2. Macam Pencerah	7
2.2.2.1. AHA (<i>Alpha Hidroxy Acid</i>)	7
2.2.2.2. Pencerah Selain AHA	12

2.2.3. Mekanisme kerja Pencerah	14
2.3. Basis Sediaan	14
2.3.1. Basis Krim	14
2.3.2. Basis Terpilih	16
2.4. <i>Tamarindus indica</i> L	16
2.4.1. Tinjauan Umum	16
2.4.2. Kandungan Kimia.....	17
2.5. Uji Efektivitas Mikrobiologi.....	17
2.5.1. Tinjauan Mikrobiologi	17
2.5.2. Organisme Kontaminan	18
2.5.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.5.2.2. <i>Escherichia coli</i>	19
2.5.2.3. <i>Candida albicans</i>	19
2.5.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.5.3. Uji Efektivitas antimikroba	20
2.5.3.1. Uji Batas <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.5.3.2. Uji Batas <i>Escherichia coli</i>	23
2.5.3.3. Uji Batas <i>Candida albicans</i>	23
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL	24
BAB IV. BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN.....	26
4.1. Bahan dan Alat.....	26
4.1.1. Bahan	26

4.1.2. Alat	26
4.2. Tahap Penelitian.....	26
4.2.1. Pembuatan Ekstrak <i>Tamarindus indica</i> L.....	26
4.2.2. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Ekstrak <i>Tamarindus indica</i> L....	27
4.2.3. Pembuatan Sediaan Pencerah <i>Vanishing Cream</i>	27
4.2.4. Karakterisasi Sediaan	28
4.2.4.1. Organoleptis	28
4.2.4.2. Pengukuran pH	28
4.2.4.3 Penentuan Viskositas	29
4.2.5. Uji Mikrobiologi	29
4.2.5.1. Pembuatan Media	29
4.2.5.2. Pembuatan Dapar Fosfat pH 7,2	29
4.2.5.3. Penyiapan Sampel	30
4.2.5.4. Penyiapan Inokulum Bakteri Uji	30
4.2.5.5. Uji Pendahuluan	30
4.2.5.6. Penapisan	31
4.2.5.7. Penetapan Angka Mikroba.....	31
4.2.5.8. Identifikasi Mikroba	31
4.3. Analisis Data	33

BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....34

5.1 Hasil Ekstraksi Daging Buah <i>Tamarindus indica</i> L.....	34
5.2 Pengukuran kadar air Ekstrak <i>Tamarindus indica</i> L dengan metode Gravimetri.....	34
5.3 Hasil Uji Kualitatif Ekstrak <i>Tamarindus indica</i> L.....	35

5.4	Hasil Penetapan Kadar Asam Total dihitung sebagai Asam Tatarat dalam Ekstrak <i>Tamarindus indica</i> L.....	35
5.4.1	Perhitungan Kadar Total Asam sebagai Asam Tatarat dalam Ekstrak <i>Tamarindus indica</i> L	35
5.4.2	Titration Standar Asam Tatarat.....	36
5.5	Pembuatan Sediaan Pencerah Kulit.....	37
5.6	Hasil Evaluasi Mutu dan Stabilitas Fisik Sediaan.....	38
5.6.1	Hasil Pengujian Organoleptis.....	38
5.6.2	Pengukuran Viskositas Sediaan.....	39
5.6.3	Pengukuran pH Sediaan.....	40
5.7	Hasil Evaluasi Efektivitas Antimikroba Sediaan Pencerah Kulit.....	42
5.7.1	Data Hasil Pengamatan.....	42
5.7.2	Hasil Analisis Data.....	45
BAB VI : PEMBAHASAN.....		47
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....		50
DAFTAR PUSTAKA.....		51
LAMPIRAN		53

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	halaman
2.1. Penampang Melintang Kulit	6
2.2. Rumus Bangun Asam Ttrat	10
2.3. Rumus Bangun Asam Malat	11
2.4. Rumus Bangun Asam Sitrat.....	11
3.5. Kerangka Konseptual	25
5.1 Kurva hubungan antara harga rata-rata viskositas sediaan dengan periode pengukuran.....	40
5.2 Kurva hubungan harga rata-rata pH sediaan dengan periode pengukuran...	41

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
2.1. Ciri Khas Morfologi <i>Staphylococcus aureus</i> pada Media Agar Selektif	22
2.2. Ciri Khas Morfologi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada Media Agar Selektif dan Diagnostik.....	22
2.3. Ciri Khas Morfologi <i>Escherichia coli</i> pada <i>MacConkey</i> Agar medium	23
4.1. Komposisi <i>Vanishing Cream Tamarindus indica</i> dalam berbagai Kadar....	27
4.2. Morfologi Bakteri pada Media Agar Selektif	32
5.1. Hasil pengamatan susut pengeringan ekstrak setelah 5, 6, 7, 8 dan 9 jam pengeringan.....	34
5.2 Hasil uji kualitatif ekstrak <i>Tamarindus indica L</i>	35
5.3 Hasil titrasi sampel (ekstrak) dengan larutan NaOH 0,9980 N.....	36
5.4 Hasil titrasi standar asam tartrat dengan NaOH 0,9980 N.....	37
5.5 Komponen sediaan <i>vanishing cream Tamarindus indica L</i>	37
5.6 Tabel pengamatan organoleptis dilakukan pada hari 1, 7, 14, 21 dan 28.....	48

5.7 Hasil pengukuran viskositas sediaan pencerah <i>vanishing cream Tamarindus indica L</i>	39
5.8 Hasil pengukuran pH sediaan pencerah <i>vanishing cream Tamarindus indica L</i>	40
5.9 Hasil pengamatan pertumbuhan koloni pada ekstrak <i>Tamarindus indica L</i> (pada konsentrasi efektif sebagai pencerah kulit) dengan kontaminan <i>Staphylococcus aureus</i>	42
5.10 Hasil pengamatan pertumbuhan koloni pada ekstrak <i>Tamarindus indica L</i> (pada konsentrasi efektif sebagai pencerah kulit) dengan kontaminan <i>Escherichia coli</i>	43
5.11 Hasil pengamatan pertumbuhan koloni pada ekstrak <i>Tamarindus indica L</i> (pada konsentrasi efektif sebagai pencerah kulit) dengan kontaminan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
5.12 Hasil pengamatan pertumbuhan koloni pada ekstrak <i>Tamarindus indica L</i> (pada konsentrasi efektif sebagai pencerah kulit) dengan kontaminan <i>Candida albicans</i>	44
5.13 Hasil pengamatan efektivitas sediaan pencerah kulit dengan basis <i>vanishing cream Tamarindus indica L 7%</i>	44

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Hasil Analisis Statistik Anova Viskositas Sediaan	53
Lampiran 2 Hasil Analisis Statistik Anova pH Sediaan.....	54
Lampiran 3 Hasil Analisis Statistik Anova Pertumbuhan Bakteri dan Jamur Pada Ekstraks <i>Tamarindus indica L</i> dengan Kandungan AHA 7% Dalam Basis <i>Vanishing Cream</i>	55
Lampiran 4 Tabel F Statistik	56
Lampiran 5 Sertifikat Mikroba Uji	57
Lampiran 6 Foto Pertumbuhan Koloni Bakteri <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Lampiran 7 Foto Pertumbuhan Koloni Jamur <i>Candida albicans</i>	59

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Manusia ingin selalu tampil menarik baik dalam berpakaian maupun berpenampilan. Salah satu cara adalah melakukan pemutihan kulit baik dengan atau tanpa menggunakan sediaan kosmetika pencerah (Zulkarnain,2000).

Sejak dahulu, orang-orang Mesir kuno telah menggunakan campuran garam laut, madu dan natrium karbonat yang digosokkan ke kulitnya untuk mengubah warna kulit. Orang Yunani kuno menggunakan campuran kacang-kacangan, mentega, susu dan roti yang dioleskan di wajah pada malam hari (Parish dan Crissay,1988).

Dewasa ini, penggunaan pencerah kulit sangat digemari terutama pada negara-negara dengan iklim tropis. Iklim tropis dengan curah sinar matahari yang tinggi memacu timbulnya hiperpigmentasi pada kulit. Hal tersebut dapat terjadi karena secara alami kulit memiliki sistem perlindungan, yaitu dengan penebalan stratum korneum dan pigmentasi pada kulit. Pada daerah tropis dengan penyinaran matahari berlebih menyebabkan kulit membentuk perlindungan alami tersebut dan apabila kulit terpapar sinar matahari akan timbul masalah hiperpigmentasi kulit.

Dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan semakin berkembangnya penelitian di bidang kosmetika, kebutuhan agar tampil menarik lebih termanjakan. Sekarang ini banyak beredar jenis-jenis kosmetika pencerah untuk tujuan meratakan pencoklatan warna kulit yang tidak merata, menghilangkan bercak-bercak noda hitam di wajah, sehingga kulit wajah tampak lebih cerah.

Perlu diingat bahwa warna kulit manusia terdiri dari warna kulit konstitutif dan warna kulit fakultatif. Warna kulit konstitutif ditentukan oleh pigmentasi melanin pada kulit yang diwariskan secara genetik tanpa dipengaruhi oleh faktor luar. Warna kulit fakultatif dipengaruhi oleh faktor-faktor luar dan menunjukkan kemampuan *tanning* setelah paparan ultraviolet, serta meningkatnya aktivitas reseptor melanosit terhadap hormon tertentu (Zulkarnain,2000).

Bahan aktif pencerah kulit sering diberikan untuk mengatasi kelainan hiperpigmentasi. Bahan pencerah yang sering digunakan akhir-akhir ini adalah *Alpha Hydroxy Acid* (AHA) dengan mekanisme pengelupasan kulit ari.

Bentuk sediaan yang lazim digunakan dalam sediaan kosmetika adalah bentuk krim minyak dalam air. Dalam penelitian ini digunakan basis krim, dengan pertimbangan sifatnya yang mudah tercucikan dalam air, tidak meninggalkan bekas bila dioleskan, memberikan rasa dingin dan lembut (Lachman, et al., 1970).

Basis sediaan yang terdiri dari fase air merupakan media yang baik untuk pertumbuhan bakteri dan jamur. Sediaan kosmetika merupakan sediaan untuk pemakaian dalam waktu lama, rentan terhadap sumber kontaminan seperti tangan konsumen dan udara terbuka. Keadaan iklim Indonesia yang lembab juga merupakan faktor pendorong pertumbuhan mikroba.

Pertumbuhan mikroba pada sediaan, berpotensi untuk terjadinya efek toksik dan dapat menjadi sumber infeksi, sehingga perlu adanya uji mikrobiologis untuk mengetahui efektivitas sediaan terhadap kontaminan mikroba.

Ada banyak sumber yang berpotensi sebagai sumber kontaminan mikroba. Sumber kontaminan tersebut dapat berasal dari bahan dasar, air yang digunakan dalam proses produksi, proses pembuatan dan prosedur pengisian, peralatan, pengemasan dan juga operator yang bekerja kurang higienis (Aulton, 1988).

Kontaminasi mikroba dapat menyebabkan turunnya kualitas produk seperti perubahan bau, warna dan viskositas sediaan yang akan sangat berpengaruh pada aspek aseptabilitas dan stabilitas sediaan. Aspek keamanan menjadi turun, karena dapat menyebabkan infeksi pada kulit konsumen.

Sediaan topikal harus bebas dari kontaminasi jenis mikroba sebagai berikut : (1). *Pseudomonas aeruginosa*, dapat menyebabkan infeksi, perubahan warna, pembentukan gas dan perubahan bau produk; (2). *Staphylococcus aureus*, merupakan mikroorganisme patogen yang memproduksi koagulase yang menyebabkan penggumpalan serum.

Sediaan kosmetika tidak harus steril, tetapi harus mampu bertahan dari pengaruh mikroba. Kandungan mikroorganisme aerob untuk sediaan kosmetika tidak boleh lebih dari 1000 koloni per gram atau mL, untuk jamur dan ragi tidak boleh lebih dari 100 koloni per gram atau mL (Harry, 1952).

Mikroorganisme dapat dihambat atau dihentikan pertumbuhannya, antara lain dengan penambahan pengawet, sterilisasi uap panas, pemanasan kering, filtrasi, sterilisasi dengan gas atau dengan radiasi.

Untuk sediaan kosmetika biasanya ditambah pengawet untuk menghambat pertumbuhan mikroba, karena dalam pemakaiannya sediaan pencerah ini sangat rentan terhadap kontaminasi mikroba dari lingkungan. Pengawet yang sesuai tidak hanya berpotensi untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang patogen, tetapi juga memperpanjang daya tahan sediaan dan mengurangi pertumbuhan mikroba selama penggunaan.

Pada penelitian ini akan dilakukan formulasi *Tamarindus indica L* sebagai sediaan pencerah dan diukur efektivitasnya terhadap mikroorganisme. *Tamarindus indica L* merupakan pohon yang banyak dijumpai pada daerah dengan iklim tropis. Selama ini banyak dimanfaatkan di bidang pengobatan dan makanan, tetapi telah lama dipercaya bahwa mengoleskan buah *Tamarindus indica L* ke kulit dapat memperhalus dan mencerahkan kulit.

Bahan aktif untuk sediaan pencerah ini didapat dari ekstraksi buah *Tamarindus indica L* yang mengandung $\pm 17\%$ asam tatarat sebagai zat aktif utamanya (Asean Herbal, 1993)

Selain mengandung asam tatarat sebagai bahan aktif utamanya, *Tamarindus indica L* juga diketahui mengandung *Tamarindineal*, yaitu suatu senyawa yang mempunyai aktivitas kuat sebagai antibakteri dan antifungi (Imbabi, et al., 1992).

Penelitian kali ini tetap akan menggunakan pengawet metil paraben dan propil paraben dengan konsentrasi yang diturunkan setiap kenaikan kadar ekstrak *Tamarindus indica L* dalam sediaan untuk mengetahui efektivitas antimikroba dalam sediaan *Vanishing cream Tamarindus indica L*.

1.2. Rumusan Masalah

Dari latar belakang di atas, permasalahan dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Apakah formula sediaan pencerah *vanishing cream* dengan bahan aktif *Tamarindus indica L* mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* ”

2. Bagaimana efektivitas sediaan pencerah *vanishing cream* dengan bahan aktif *Tamarindus indica L* terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* ”

1.3. Tujuan Penelitian

Untuk membuat formula sediaan pencerah *vanishing cream* dengan bahan aktif *Tamarindus indica L* dan menguji efektivitasnya terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* dengan dan tanpa penambahan pengawet metil paraben dan propil paraben.

1.4. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah sediaan pencerah *vanishing cream* dengan bahan aktif *Tamarindus indica L* mempunyai efektivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang efektivitas mikrobiologis sediaan pencerah *vanishing cream* dengan bahan aktif *Tamarindus indica L*, sehingga dapat digunakan untuk sediaan pencerah yang aman bagi konsumen.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Kulit

2.1.1. Tinjauan Umum

Kulit merupakan lapisan pelindung tubuh yang paling sempurna terhadap pengaruh luar, karena mampu menahan penembusan bahan gas, cair maupun padat baik yang berasal dari lingkungan luar tubuh maupun dari komponen organisme. Meskipun kulit relatif permeabel, dalam keadaan tertentu dapat ditembus oleh senyawa obat, sehingga menimbulkan efek terapeutik (Aiche,1993).

Penilaian aktivitas farmakologik sediaan topikal menunjukkan pentingnya bahan pembawa dalam proses pelepasan dan penyerapan bahan aktif (Aiche,1993).

Pada kosmetologi, umumnya hanya fase penembusan yang diteliti. Sediaan kosmetika digunakan pada hampir seluruh permukaan kulit dan aneksanya, oleh sebab itulah kemampuan menembus sediaan kosmetika harus dibatasi sampai difusi ke dalam lapisan tanduk (*stratum corneum*), folikel rambut dan kelenjar keringat (Aiche,1993).

2.1.2. Anatomi dan Fisiologi Kulit

Kulit merupakan jaringan perlindungan yang lentur dan elastis, menutupi seluruh permukaan tubuh dan merupakan 5 % berat tubuh (Aiche, 1993).

Kulit juga berperan dalam regulasi suhu badan, mengatur regulasi tekanan darah, dan sebagai pelindung tubuh dari kerusakan akibat radiasi, benturan fisik, kontaminasi zat kimia dan mikroorganisme. Secara anatomi, kulit terdiri dari banyak lapisan jaringan, tetapi secara umum kulit dibagi dalam tiga lapisan yaitu *stratum korneum*, epidermis dan dermis (Gambar 2.1). *Stratum korneum* merupakan jaringan heterogen atau disebut lapisan tanduk yang terdiri dari sel padat, mati dan keratin yang berlapis lapis dengan kerapatan 1,55 (Lachman,et al.,1970).

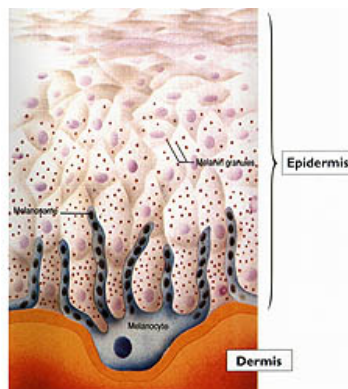
Epidermis merupakan lapisan epitel, tebal rata-rata 200 mikrometer , dengan sel-sel yang berdeferensiasi bertahap dari bagian yang lebih dalam menuju ke permukaan dengan proses keratinasi (Aiache,1993).

Epidermis dibedakan atas 2 bagian, yaitu: (1). Lapisan Malpigi yang hidup, menempel pada dermis ; (2). *Stratum Corneum* (lapisan tanduk) yang tersusun atas sekumpulan sel-sel mati yang mengalami keratinasi (Aiache,1993).

Badan Malpigi yang hidup terdiri dari beberapa lapisan : (1). *Stratum basale*, yaitu lapisan yang berada tepat di atas dermis, merupakan lapisan tunggal yang secara terus menerus bertugas memproduksi *keratinocytes*. ; (2). *Stratum spinosum*, merupakan lapisan-lapisan sel berduri, terdapat tonofilamen yang dipercaya sebagai pembentuk awal dari keratin. ; (3). *Stratum granulosum*, lapisan granular yang berada di atas lapisan sel duri, sel ini terdiri dari granul basofil dari *keratohyalin*. ; (4). *Stratum lucidum*, bagian dari kulit tangan dan kaki. Lapisan di atas lapisan granular yang bersifat *acidophilic* dan relatif lebih tebal, sel dari lapisan ini tak berinti. Fungsi dari lapisan bening dalam proses keratinisasi belum jelas (Harry, 1952).

Stratum korneum merupakan sekumpulan sel-sel mati yang terletak tepat diatas *stratum lucidum* dan merupakan bagian terluar dari epidermis. Lapisan ini terdiri dari sel mati, rata dan penuh dengan sel-sel keratin yang tersusun berjajar dari lapisan paling atas sampai kedalaman 0,12-0,8 mm (Harry, 1952).

Dermis adalah lapisan kulit di bawah epidermis, tebal sekitar 3,2 mm dan merupakan bagian kulit yang terbesar. Terdiri dari sel yang berperan dalam pengeluaran elastin dan kolagen (Depkes,1994).



Gambar 2.1 Penampang melintang kulit

2.2. Kosmetika Pencerah

2.2.1. Tinjauan Umum

Jauh sebelum ditemukannya struktur kimia dari AHA, orang-orang dulu telah menggunakan bahan alam yang mengandung AHA untuk perawatan kulitnya. Wanita Mesir mandi dengan menggunakan susu untuk melembutkan kulitnya. Wanita Prancis pada masa pemerintahan Louis XIV mencuci muka dengan fermentasi anggur untuk alasan yang sama. Dahulu orang-orang merawat wajahnya dengan menggunakan masker yang berasal dari buah, madu, atau yogurt yang sekarang telah diketahui bahwa bahan-bahan tersebut ternyata mengandung AHA sebagai bahan aktifnya (Sepp,1998).

Berdasarkan pengalaman di atas, maka pencerah kulit digunakan untuk kelainan pigmentasi kulit yaitu terjadinya hiperpigmentasi namun juga untuk seluruh tubuh (Zulkarnain,2000).

2.2.2. Macam Pencerah

2.2.2.1. AHA (*Alpha Hydroxy Acid*)

a. Cara Kerja AHA

Mekanisme kerja AHA belum sepenuhnya dimengerti. Mekanisme yang telah diketahui antara lain:

1. AHA bekerja sebagai humektan sederhana yang menyerap lembab dari atmosfer, ketika digunakan pada kulit, AHA menghidrasi dengan cara meningkatkan kandungan air pada kulit dan melembabkan bagian terluar epidermis (stratum korneum), oleh karena itu menjadikan kulit lembut dan lentur.
2. Bekerja dengan mengurangi adesi dan mempercepat pengelupasan sel lapisan kulit yang lebih dalam. Aksi pengelupasan ini menunjukkan kemampuannya untuk memecah ikatan sel kulit mati yang terbentuk dipermukaan kulit. Kulit normal mempunyai lapisan sel mati pada permukaannya dan AHA dapat mempercepat proses regenerasi sel dan pengelupasannya . Dengan demikian, formasi kulit kering pada permukaan akan menurun sehingga kulit akan menjadi elastis. Ketika digunakan untuk *peeling*, AHA bekerja pada tingkat yang lebih dalam dan menyebabkan

terkelupasnya keratin dan epidermis. Pada konsentrasi yang lebih rendah, AHA terutama mengurangi kohesi antar korneosit, sehingga pengelupasan terjadi lebih cepat yang mengakibatkan semakin menipisnya stratum korneum. Stratum korneum tersebut akan lebih kompak dan elastis (Sepp,1998).

3. Sebagian besar fakta mengenai kerja AHA terlihat pada pengelupasan dan pergantian sel kulit baru pada lapisan terluar epidermis kulit. Fakta baru menunjukkan bahwa AHA mungkin bekerja pada lapisan kulit yang lebih dalam. AHA meningkatkan pembentukan prokolagen dan kolagen tipe I pada lapisan dermis pada perawatan dalam waktu yang lama. Satu studi yang menarik yakni penggunaan AHA dua kali sehari dalam 3 bulan dengan konsentrasi 5%, pH 2,8 memperlihatkan efek perubahan pada permukaan dan epidermal. Sementara itu, pada perawatan yang sama tetapi dengan konsentrasi 12% akan menjangkau lapisan yang lebih dalam dan mempengaruhi lapisan epidermis serta lapisan dermis. Kedua konsentrasi tersebut menunjukkan perubahan pada kulit menjadi lebih lembut dan menyamarkan garis dan kerut. Studi lain menunjukkan bahwa AHA dapat menipiskan stratum corneum, tetapi sebenarnya hasil akhir kerja AHA adalah meningkatkan ketebalan secara menyeluruh pada epidermis. Ketebalan ini terbentuk oleh sintesis *glycosaminoglycans* dan kolagen. Hal ini menunjukkan bahwa ternyata kerja AHA lebih dari sekedar meningkatkan pengelupasan dan pergantian sel kulit.

b. Efektivitas AHA

Efektivitas AHA pada penggunaannya sebagai pengelupas tergantung pada konsentrasi dan pH pada sediaan yang dipilih, tetapi secara mengejutkan efektivitasnya tidak tergantung pada jenis AHA yang digunakan. Sebagai contoh asam glikolat dan asam laktat pada konsentrasi dan pH yang sama menunjukkan hasil yang sama dalam pembaharuan sel. pH optimum untuk menstimulasi perbaharuan sel sekitar 3. Untuk pH di atas 6.0 kerja AHA sebagai pengelupas tidak efektif tetapi lebih berperan sebagai pelembab. Hal ini menunjukkan tidak ada konsentrasi optimum dalam penggunaan AHA, konsentrasi yang dipilih tergantung pada tujuan penggunaan AHA, apakah itu untuk penggunaan sebagai *peeling*

(konsentrasi >70%) atau untuk penggunaan sebagai *over-the-counter cream* (10%). Keamanan adalah pertimbangan utama dalam penentuan konsentrasi AHA yang digunakan.

Hubungan antara kekuatan AHA dan pH yang digunakan tidak dapat diperkirakan. Secara intuisi hal ini dapat diperkirakan bahwa pada konsentrasi tinggi AHA lebih poten. Ini harus dikenali bahwa bentuk asam bebas molekul AHA merupakan bagian yang mampu menstimulasi perbaruan kulit. Efek minimum pada umumnya didapatkan pada konsentrasi 4%. Secara matematik dapat dihitung bahwa untuk mendapatkan 4 % asam bebas pada pH 3,8 dibutuhkan AHA konsentrasi 8%. Jika pH pada preparat yang sama diperkirakan lebih rendah dari 1,0, asam bebas yang tersedia dapat meningkat lebih dari 7%. Sebaliknya, jika pH ditingkatkan sampai 6 atau lebih, asam bebas yang tersedia menurun hingga di bawah 1%. Dengan demikian, formula AHA pada konsentrasi 8% dapat bekerja dengan sangat efektif sebagai stimulator pembaharuan kulit pada pH 1 (tetapi sangat mengiritasi). Pada pH 6 atau lebih hanya akan memberikan efek sebagai pelembab. Inilah sebabnya pada sediaan yang dijual di pasar harus mencantumkan jenis AHA, konsentrasi serta pHnya.

c. Efek Jangka Panjang

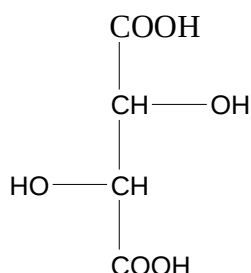
Meski AHA merupakan bahan kosmetika yang menakjubkan di era 90an, namun keamanannya benar-benar perlu diperhatikan. FDA memfokuskan pada 2 masalah penting, yaitu: sensitivitas terhadap sinar matahari dan efek jangka panjang akibat iritasi kulit.

CTFA (*Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association*) mengadakan studi mengenai keamanan penggunaan asam glikolat dan asam laktat. Mereka menyimpulkan bahwa di salon penggunaan yang aman pada konsentrasi 30% atau kurang dan pH 3 atau lebih. CTFA juga merekomendasikan konsentrasi maksimum untuk produk umum dipasaran adalah 10% dengan pH 3 atau lebih. Pada kasus lain mereka juga merekomendasikan bahwa perawatan menggunakan AHA harus disertai dengan *sun protection* (minimal SPF 15).

Fakta menunjukkan bahwa adanya iritasi kimia akibat penggunaan AHA secara terus-menerus dalam jangka waktu yang lama dapat meningkatkan iritasi jaringan yang kronis dan efek lain yang merugikan.

d. Jenis – jenis AHA

- Asam Tatrart



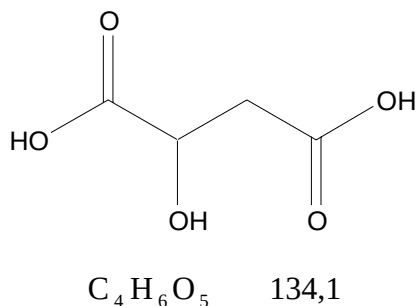
Gambar 2.2. Rumus bangun Asam Tatrart

Asam tartrat merupakan salah satu jenis AHA yang terkandung dalam *Tamarindus indica L.* Asam tartrat merupakan asam terkuat antara asam lainnya, dengan pKa 3,04 (berbeda 1 unit pKa menunjukkan sepuluh kali lipat perbedaan kekuatannya).

Adapun sifat fisika kimianya: Rumus molekul $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$; berat molekul 150,09. Mempunyai nama kimia (+) L-2,3 Dihidroxybutanediocacid. Pemerian dari asam tartrat adalah hablur, tidak berwarna atau bening atau serbuk hablur putih, hampir putih. Asam tartrat larut dalam air 1 : 8 ;air mendidih 1 : 0.5 ; alkohol 1: 3 ; ether 1 : 250 ; dan dalam metil alkohol 1 : 1,7.

Asam tartrat merupakan salah satu AHA yang memiliki antioksidan. Sebagai antioksidan, asam tartrat menetralkan jenis oksigen reaktif (radikal bebas). Molekul yang sangat reaktif tersebut diproduksi oleh interaksi sinar matahari, sel membran dan komponen lain pada jaringan kulit. Antioksidan tidak menyerap sinar, oleh sebab itu jika tidak menggunakan sunscreen maka jangan menjadikan antioksidan sebagai pengganti *sunscreen*, tetapi dilain pihak antioksidan merupakan paduan yang baik untuk produk *sunscreen*. Radikal bebas dirangsang oleh sinar ultraviolet dan juga dapat terjadi secara natural oleh adanya oksigen atmosfer.

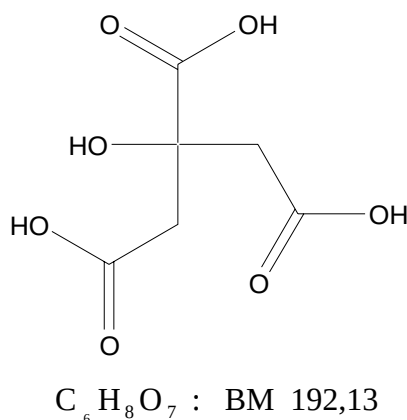
- **Asam Malat**



Gambar 2.3. Rumus bangun Asam Malat

Asam malat terdapat dalam buah apel, pear, dan berbagai buah-buahan yang lain. Pemerian kristal tidak berwarna, tidak berbau, dan bersifat *deliquescent*. TL 99°C . Kelarutan sangat larut dalam air, 1 dalam 2 bagian alkohol dan eter, 1 dalam 1 bagian metanol. Pada umumnya digunakan sebagai pengawet makanan.

- **Asam Sitrat**



Gambar 2.4. Rumus bangun Asam sitrat

Asam sitrat berbentuk anhidrat atau mengandung satu molekul air hidrat. Mengandung tidak kurang dari 99,5 % dan tidak lebih dari 100,5 % $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, dihitung terhadap zat anhidrat. Pemerian hablur bening, tidak berwarna atau serbuk hablur granul sampai halus, putih; tidak berbau atau praktis tidak berbau; rasa sangat asam. Bentuk hidrat mekar dalam udara kering. Satu bagian asam sitrat larut dalam kurang dari 1 bagian dari air; 1 dalam 1,5 alkohol; 1 dalam 2 gliserol; 1 dalam 30 eter. 6 % larutan asam sitrat dalam air memiliki keasaman yang kira-kira sama dengan sari jeruk nipis. Larutan 5,52 % dalam air isoosmotik dengan serum.

2.2.2.2. Pencerah Selain AHA

a. *Hydroquinone*

Mencerahkan warna kulit yang dikehendaki dengan cara membunuh sel yang memproduksi melanin atau yang biasa disebut *melanocyte*. Yang perlu diperhatikan saat pemakaian *hydroquinone* haruslah terhindar dari sinar matahari dan selalu menggunakan *sunblock* saat keluar rumah. Tidak ada masalah yang berarti selama pemakaian lebih dari 3 bulan (Taylor,2001).

b. *Kojic acid*

Pertama ditemukan di Jepang pada tahun 1907, digunakan sebagai alternatif *hydroquinone*. *Kojic Acid* bukan termasuk AHA, tapi mempunyai mekanisme kerja yang sama dengan *hydroquinone*, dan hasil penelitian menunjukkan bahwa *kojic acid* efektif sebagai penghambat produksi melanin. *Kojic Acid* kurang mengiritasi dibanding *hydroquinone* (Taylor,2001).

c. *Monobenzon*

Nama kimia *monobenzon* adalah *monobenzil eter hidroquinon*. Mekanisme kerja mirip dengan *hydroquinone*, namun juga menyebabkan destruksi melanosit yang ekstensif. Digunakan untuk menghilangkan warna normal yang tersisa pada pasien vitiligo yang luas dan diikuti pemakaian tabir surya secara teratur. Preparat yang tersedia Beniquin 20 % untuk orang dewasa atau di atas 12 tahun digunakan 2 kali sehari selama 3 sampai 9 bulan. Obat ini dilarang peredarannya sebagai kosmetik (Zukarnaen,2003).

d. Niasiamida

Niasiamida adalah provitamin B3 yang bekerja dengan cara mengganggu pembentukan tirosinase. Niasiamida tidak menyebabkan vasodilatasi seperti asam nikotinat. Selain itu gugus amida aktif dan niasin (vit B3) mempunyai efek anti inflamasi dan anti oksidan, sehingga mengurangi eritem akibat pengaruh sinar ultraviolet (Zulkarnaen,2003).

e. Asam Azaleat

Asam Azaleat adalah asam dikarboksilat yang namanya berasal asam oleat yang dioksidasi oleh nirit (azote = az = nitrogen, elain = oil), dapat dibuat dari oksidasi asam lemak tidak jenuh pada posisi C₉, juga dengan fermentasi oleh mikroorganisme seperti pada bahan alami yang ditemukan biji-bijian gandum, rye

dan *barley*, dapat juga terbentuk dari oksidasi asam linoleat. Efektivitas Asam azaleat pada pengobatan malesma berhubungan dengan efek selektif pada melanosit yang hiperaktif. Asam azaleat menghambat tirosinase yang aktif dan oksireduktase lainnya serta enzim mitokondria dan memulihkan respon hipermelanosis menjadi normal (Zulkarnain,2003). Efek samping seperti gatal, eritema ringan, bersisik dan rasa terbakar biasanya berkurang setelah 2-4 minggu. Penggunaan krem Asam Azaleat 20% secara topikal akan diabsorpsi ke dalam dermis. Absorpsi perkutan sangat rendah kurang lebih hanya 3,6% zat aktif yang beredar dalam sirkulasi sistemik. Aktivitas depigmentasi terhenti jika warna kulit sudah normal (Zulkarnain,2003).

f. Teh hijau (*Green Tea*)

Teh hijau mengandung banyak senyawa polifenol yang mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Teh hijau kini banyak digunakan dalam industri kosmetik.

g. *Licorice* (Akar manis, Bengkuang)

Merupakan ekstrak yang diekstraksi dari umbi-umbian spesies *Glycyrrhiza*, *Glabirdin*, *Glabrene* dan *Lico chalcone*. Terdiri atas 2 macam yaitu: *Licorice PT* (yang mengandung inhibitor tirosinase) dan *Licorice PU* (yang mengandung absorber UVA dan UVB). Komponen aktifnya adalah glabiridin. Mekanisme kerjanya menghambat aktivitas tirosinase dan DOPA *chrometautomerase*. Jika diberikan 3 kali sehari dalam 4 minggu dengan konsentrasi 0,1% dapat memutihkan kulit secara bermakna. Dalam menghambat aktivitas tirosinase *licorice* lebih kuat dibanding asam kojik dan asam askorbat (Zulkarnain,2000).

h. Asam Askorbat

Vitamin C dan turunannya merupakan bahan pereduksi pada rangkaian pembentukan melanin yaitu dengan menghambat rantai oksidasi dari tirosin/DOPA menjadi melanin, juga menghambat perubahan DOPA menjadi Dopakuinon sehingga pembentukan melanin menurun. Bahan aktifnya adalah karbon ikatan rangkap dengan 2 gugus hidroksil. Molekul tersebut dapat melepaskan 2 elektron pada radikal bebas, sehingga asam askorbat juga berperan sebagai anti oksidan. Asam askorbat mudah teroksidasi dan tidak stabil. Takashima(1971) mempelajari sejumlah ester asam askorbat dan stabilitasnya jika dicampur dengan krim

kosmetik, menjumpai bahwa garam magnesium asam askorbat 3-pospat mempunyai efek pencerah pada manusia.

2.2.3. Mekanisme Kerja Pencerah

a. Menghambat Pembentukan Melanin

Melanocyte mensintesis melanin dari asam amino (suatu senyawa protein) dan tyrosine. *Melanocyte* dapat disintesis oleh hormon pada kelenjar *pituitary* yang disebut *melanocyte stimulating hormon (MSH)*. Penghambatan pembentukan melanin dapat dicegah dengan cara menghambat katalisator yang mengkonversi tirosin menjadi intermediat biokimianya (Ocean Health,2001). Bahan pencerah yang bekerja dengan cara tersebut adalah arbutin, *kojic acid*, *hydroquinone*

b. Mempercepat Metabolisme Melanin

Proses metabolisme melanin dapat dipercepat dengan cara mengurangi ketebalan hiperkeratik dengan penurunan kohesi korneosit dengan zat endogen atau dengan mengganti biosintesa glikoaminoglikan dan substansi selular di bawahnya dengan menyeimbangkan bahan intermediat. Bahan yang menggunakan cara tersebut sebagai mekanisme kerjanya adalah *Alpha Hydroxy Acid*.

c. Mempercepat Eliminasi Melanin

Percepatan eliminasi dapat dilakukan dengan cara mengikis kulit yang telah mati secara fisik dengan menggunakan *peeling*. Percepatan eliminasi dapat juga dengan menggunakan alat khusus seperti sinar laser (Shevlin,1972; Soeratri,2000).

2.3. Basis Sediaan

2.3.1. Basis Krim

Definisi krim menurut Farmakope Indonesia IV tahun 1995 adalah bentuk sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan yang terlarut/terdispersi di basis yang sesuai dan digunakan untuk pemakaian luar.

Berdasarkan tipe emulsi basis krim dibedakan menjadi: (1). Krim tipe minyak dalam air (m/a), merupakan krim yang paling sering digunakan karena memiliki banyak keuntungan seperti efek obat yang lebih cepat, rasa dingin,

mudah dibersihkan dari kulit dan dapat dicuci dengan air; (2). Krim tipe air dalam minyak (a/m), memiliki basis serap yang dibentuk dengan penambahan zat-zat yang dapat bercampur dengan hidrokarbon dan zat-zat yang memiliki gugus polar seperti sulfat, sulfonat, karboksil, sehingga basis hidrokarbon bersifat hidrofilik (Lachman, 1972; Idson dan Lazarus, 1994).

Berdasarkan muatan emulgatornya basis krim dibedakan atas surfaktan ionik dan surfaktan nonionik. Surfaktan ionik terbagi menjadi: (1). Anionik, surfaktan jenis ini mempunyai sifat penyabunan yang baik dan dapat menimbulkan busa. Krim dengan surfaktan ini bersifat basa lemah. Contoh : sabun asam lemak, alkil sulfat, monogliserida sulfat; (2). Kationik, kurang menimbulkan busa dan kurang mempunyai daya bersih dibanding surfaktan ionik. Bersifat iritan sehingga jarang digunakan.; (3). Amfoterik, sediaan dengan surfaktan amfoterik sekarang ini terus dikembangkan di bidang kosmetika, karena memberi rasa lembut di kulit.

Syarat dasar krim ideal adalah: (1). Tidak mengiritasi.; (2). Tidak menyebabkan dehidrasi kulit.; (3). Tidak berminyak.; (4). Dapat campur dengan bahan aktif.; (5). Stabil secara fisika kimia.; (6). Dapat tercuci dengan air; (7). Dapat melepaskan bahan aktif.; (8). Nyaman dalam pemakaian (Blaugh, 1975).

Pertimbangan yang penting dalam pemilihan pembawa adalah: (1). Kelarutan bahan obat dalam pembawa; (2). Kecepatan pelepasan obat dari pembawa; (3). Kemampuan pembawa dalam menghidrasi stratum korneum; (4). Stabilitas bahan aktif dalam pembawa; (5). Interaksi fisika-kimia dari pembawa, stratum korneum, bahan aktif; (6). Inert (Katzung, 1989).

2.3.2. Basis Terpilih

Basis yang terpilih untuk penelitian kali ini adalah *Vanishing Cream*.

Adapun formula *vanishing cream* sebagai berikut:

Asam stearat	14,0 g
Setil alkohol	1,0 g
Isopropil palmitat	1,0 g
Metil Paraben	0,1 g
Propil Paraben	0,05 g
Span 60	2,0 g
Sorbitol 70%	3,0 g
Tween 80	1,5 g
Aquadest ad	100,0g

(Lachman,1972).

2.4. *Tamarindus indica L*

2.4.1. Tinjauan Umum

Asam jawa yang memiliki nama latin *Tamarindus indica L.*, merupakan anggota dari familia Caesalpiniace. Pohonnya dapat mencapai ketinggian 15-25 m. Daunnya berseling, menyirip genap, dengan panjang 5-13 cm. Anak daun berhadapan 10-15 pasang, memanjang sampai berbentuk garis, sisi bawahnya berwarna hijau biru. Tandan bunga hampir tunduk, panjang 2-16 cm dan anak tangkai 1,0-1,5 cm. Daun penumpu cepat rontok. Tabung mahkota berwarna hijau, dengan tinggi 0,5 cm, taju memanjang, runcing, warna kuning, panjang 1 cm. Ketiga daun mahkota yang besar memanjang bulat telur terbalik, keriting dengan panjang sekitar 1 cm, yang dua terbawah panjang 1-2 cm. Benang sari bersatu sampai jauh di atas, 3 benang sari yang sempurna berseling dengan staminodia yang berbentuk gigi. Bakal buah di atas tangkai yang bersatu dengan tabung kelopak. Potongan bertangkai, memanjang sampai berbentuk garis tebal, di antara biji dengan sekat, coklat suram dan gundul. Di antara biji kerap kali menyempit, 3,5-20 kali 2,5 cm. Dinding luar rapuh, daging buah berasa asam, biji 1-12, dengan warna coklat mengkilap, mempunyai nama nasional yang berbeda beda di masing-masing negara. Di Indonesia, Malaysia dan Singapura dikenal dengan nama Asam

Jawa. Di Filipina mempunyai nama Sampalok dan di Thailand disebut Makham (Asean Herbal,1993).

Tamarindus indica L berasal dari daerah tropis Afrika, berkembang di berbagai daerah yang beriklim tropis. *Tamarindus indica L* dapat beradaptasi dengan baik di daerah tropis dan masih dapat tumbuh di daerah dengan curah hujan tinggi, asam jawa juga mentoleransi keadaan gersang. *Tamarindus indica L* mempunyai waktu panen di saat buahnya berubah warna menjadi coklat dan perikarpiumnya mulai rapuh (Asean Herbal,1993).

2.4.2. Kandungan Kimia

Buahnya mengandung : asam tartat, asam suksinat, asam sitrat, asam malat, maltosa, sukrosa, *β -alanine, 1-leucine, phenylalanine, 1-pipecolic acid, 1-proline, 1-serine, oxalic acid, oxalacetic acid, oxalo-succinic acid, glyoxilic acid, arabinose glucose, mannose, pentosans dan pectin*. Selain kandungan di atas, juga mengandung: vitamin A, vitamin B, vitamin C, sterol, terpen, saponin, flavonoid. Sebagian besar asam terikat oleh kalium, antara lain kalium bitartat (Asean Herbal,1993).

2.5. Uji Efektivitas Mikrobiologi

2.5.1. Tinjauan Mikrobiologi

Mikroba ditemukan hampir di semua kehidupan di bumi, termasuk di tempat-tempat di mana makhluk lain tidak dapat bertahan hidup (Black,1999).

Mikroba dapat bertahan hidup di berbagai lingkungan karena bentuk mereka yang kecil dan mudah berubah, menempati ruang yang kecil, hanya membutuhkan sedikit nutrisi dan mempunyai kemampuan untuk mudah beradaptasi pada perubahan lingkungan (Black, 1999).

Selain hal tersebut, pertumbuhan mikroba juga dipengaruhi oleh beberapa faktor, baik faktor fisika maupun biokimia. Faktor fisika meliputi: (1) pH, mikroba mempunyai pH optimum yang biasanya mendekati pH netral. Menurut toleransinya terhadap keadaan asam-basa, mikroba dibedakan: *acidophiles* (pH 0,1 - 5,4), *neutrophiles* (pH 5,4 - 8,5) dan *alkaliphiles* (pH 7,0 - 11,5); (2) Temperatur, kebanyakan bakteri hidup pada suhu berkisar 30° C, tetapi suhu

minimum dan maksimumnya sangat bervariasi. Menurut batas temperatur minimum dan maksimumnya mikroba dibagi menjadi: *psychrophiles* (15°-20°C), *mesophiles* (25°-40°C) dan *thermophiles* (50°-60°C); (3) Oksigen, berdasarkan kebutuhannya akan oksigen mikroba digolongkan: anaerob, obligat anaerob, fakultatif anaerob, aerob dan obligat aerob; (4) Kelembaban, metabolisme mikroba dapat aktif bila terdapat air sebagai media tumbuhnya. Di lingkungan yang kering, mikroba dapat bertahan dengan membentuk spora tetapi tidak aktif; (5) Tekanan hidrostatik ; dan (6) Tekanan Osmotik. Sedangkan faktor biokimia (nutrisi) meliputi: (1) Sumber karbon, digunakan sebagai sumber energi oleh kebanyakan bakteri; (2) Nitrogen, digunakan mikroorganisme untuk mensintesis enzim, protein dan asam amino; (3) Belerang dan Pospor, digunakan untuk memenuhi kebutuhan mineral mikroba; (4) Elemen lain seperti: vitamin, tembaga, besi, seng, natrium, kalium dan lain lain (Black,1999).

2.5.2. Organisme Kontaminan

Basis sediaan yang terdiri dari fase air merupakan media yang baik untuk pertumbuhan bakteri dan jamur. Sumber kontaminasi yang potensial dalam sediaan pencerah dapat berasal dari bahan alam yang digunakan, air yang digunakan pada proses produksi, lingkungan tempat pembuatan dan selama penggunaan oleh konsumen (Barry,1952).

Untuk sediaan pencerah yang merupakan sediaan topikal dipersyaratkan harus bebas dari organisme patogen, antara lain *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* (anonim,1994).

2.5.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa bersifat motil dan berbentuk batang. Berukuran 0,6 x 2 µm. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan gram negatif dan terdapat dalam bentuk bakteri tunggal, berpasangan dan kadang dalam bentuk rantai pendek.

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri *obligat aerob* yang dapat tumbuh dengan cepat di berbagai media, kadang memproduksi gula berasa seperti anggur. Sebagian dapat menghemolisa darah. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni bundar yang lembut dengan fluoresensi hijau.

Kultur *Pseudomonas aeruginosa* dapat memproduksi berbagai tipe koloni dan masing-masing tipe mempunyai sifat biokimia dan aktivitas enzim yang berbeda. *Pseudomonas aeruginosa* tumbuh baik dalam suhu 37-42°C, merupakan oksidan positif, setelah diinkubasi 24 jam terbentuk koloni yang lebar, lembut, lunak, licin, berpencar dan dapat menutupi seluruh permukaan medium. Koloni tidak berpigmen, berfluorensi hijau terang dan kembali gelap setelah beberapa hari (Smith, et al, 1942).

2.5.2.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli berbentuk batang pendek tetapi besar, lebar 0,4-0,7 µm dan panjang 1-4 µm. Dalam kultur yang masih baru *Escherichia coli* mempunyai bentuk *coccoid* dan berantai pendek untuk bergerak. Dalam kultur yang sudah lama basil menjadi panjang dan berbentuk filamen. Bakteri ini tidak berspora tetapi pada sebagian kecil terlihat berkapsul dan merupakan bakteri Gram negatif.

Escherichia coli bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif, tumbuh cepat dalam 24 jam dalam semua media pada suhu 20 - 40°C dan dapat hidup dalam media yang mengandung garam anorganik, garam amonium dan dekstrose (Smith, et al., 1948).

Pada lempeng agar, permukaan koloni terlihat dalam waktu 12 – 24 jam, sebesar 2 – 3 mm dalam waktu 48 jam. Koloni pendek, cembung, lunak, licin dan tidak berwarna (Smith, et al, 1948).

Morfologi koloni pada media *Mac Conkey Agar* (MCA) membentuk koloni merah bata yang dikelilingi daerah terdiri dari endapan empedu. Pada pewarnaan Gram berbentuk batang atau batang bulat (Depkes RI, 1995).

2.5.2.3. *Candida albicans*

Candida albicans merupakan kuman Gram positif, berbentuk oval, mempunyai sel ragi, berukuran 2-3 x 4-6 µm.

Kultur dalam *Sabouraud's agar* yang diinkubasi dalam suhu kamar (20-24°C), lembut, membentuk koloni krim berwarna yang berasa ragi. Permukaannya tumbuh membentuk sel oval, dan lapisan bawahnya mengandung *pseudomycelium* (Melnick & Adelberg's, 1991).

Candida albicans berbentuk oval, mempunyai ragi yang memproduksi *pseudomycelium* baik dalam kultur maupun dalam jaringan. *Candida albicans* merupakan anggota flora normal dari membran mukosa pernafasan, gastrointestinal dan organ genital wanita (Melnick & Adelberg's, 1991).

Candida albicans menfermentasi glukosa dan maltosa, memproduksi asam dan gas, produksi asam dari sukrosa dan tidak menyerang laktosa (Melnick & Adelberg's, 1991).

2.5.2.4. *Staphylococcus aureus*

Pada lempeng agar nutrien, koloni yang tumbuh biasanya berdiameter 1-2 mm, cembung, gelap, berkilau pada seluruh tepinya dan lembut, warna koloni kuning emas, tetapi warna ini dapat berubah menjadi gelap atau lebih intensif (Smith, et al, 1948).

2.5.3. Uji Efektivitas Pengawet Antimikroba

Pengujian efektivitas pengawet antimikroba dimaksudkan untuk menunjukkan efektivitas pengawet antimikroba yang ditambahkan pada sediaan yang dibuat dengan dasar atau bahan pembawa mengandung air. Untuk mikroba uji digunakan *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. Masing-masing sampel diinokulasi suspensi mikroba baku menggunakan perbandingan 0,1 mL inokula setara dengan 20 mL sediaan, kemudian dicampur. Mikroba uji dengan jumlah yang sesuai harus ditambahkan sedemikian rupa sehingga jumlah mikroba di dalam sediaan uji adalah antara 100.000 sampai dengan 1.000.000 per mL. Jumlah mikroba viabel ditetapkan dalam tiap suspensi inokula. Pengamatan pertumbuhan koloni dilakukan pada hari ke-7, 14, 21 dan 28 setelah inokulasi. Penafsiran hasil suatu pengawet dinyatakan efektif jika jumlah bakteri viable pada hari ke-14 berkurang hingga tidak lebih dari 0,1% dari jumlah awal dan jumlah tiap mikroba uji selama hari tersisa dari 28 hari pengujian adalah tetap atau kurang dari 0,1%(Depkes,1995).

2.5.3.1. Uji Batas *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Sebanyak 10,0 mL spesimen ditambahkan Media FSCD (*Fluid Soybean Casein Digest Medium*) hingga 100 mL, campur dan inkubasikan. Pertumbuhan pada media diamati dan jika terdapat pertumbuhan, dengan menggunakan sengkeli inokulasikan biakan pada permukaan lempeng Media VJA (*Vogel – Jonhson Agar*) dan media CETA (*Centrimide Agar*). Tutup cawan kemudian dibalik dan diinkubasi. Jika setelah pengamatan tidak satupun dari cawan mengandung koloni yang mempunyai ciri seperti pada Tabel 2.1 dan 2.2 untuk media yang digunakan, maka spesimen dinyatakan bebas dari *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Depkes RI, 1995).

1. UJI KOAGULASE (Untuk *Staphylococcus aureus*).

Dengan menggunakan sengkeli, spesimen yang diduga mengandung *Staphylococcus aureus* dipindahkan dari permukaan media VJA ke dalam masing-masing tabung yang berisi 0,5 mL plasma mamalia, diutamakan plasma kelinci atau kuda, dengan atau tanpa zat tambahan yang sesuai. Inkubasi dalam tangas air pada suhu 37°C dan amati tabung pada jam ke 3 dan selanjutnya pada jarak waktu yang sesuai selama 24 jam. Dilakukan uji kontrol positif dan negatif bersamaan dengan uji spesimen. Spesimen dinyatakan bebas, jika sama sekali tidak terjadi koagulase.

2. UJI OKSIDASI dan PIGMEN (Untuk *Pseudomonas aeruginosa*).

Dengan menggunakan sengkeli, spesimen yang diduga mengandung *Pseudomonas aeruginosa* diambil dari media CETA masing-masing ke media PAP (*Pseudomonas Agar Medium for Detection Pyocyanin*) dan PAF (*Pseudomonas Agar Medium for Detection fluorescin*) yang terdapat dalam cawan petri. Koloni diinokulasi. Media yang telah diinokulasi ditutup dan dibalik, kemudian diinkubasi pada suhu $35^{\circ} \pm 2^{\circ}$ selama tidak kurang dari 3 hari. Diamati permukaan cawan yang diinokulasi di bawah cahaya ultraviolet untuk menetapkan apakah terdapat koloni yang menunjukkan sifat khas seperti tertera pada Tabel 2.2

Lakukan uji Oksidase terhadap pertumbuhan koloni tersangka pada satu atau lebih media, untuk konfirmasi *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* diletakkan ke atas koloni tersebut atau pindahkan pertumbuhan koloni ke atas potongan kertas saring yang sebelumnya telah diimpregnasi dengan N,N-

p-fenilendiamina di-hidroklorida. Jika tidak terjadi perubahan warna merah muda menjadi lembayung, spesimen dinyatakan memenuhi syarat bebas *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabel 2.1. Ciri khas morfologi *Staphylococcus aureus* pada Media Agar Selektif

Media selektif	Ciri khas Morfologi Koloni	Pewarnaan Gram
Vogel Johnson Agar Medium	Hitam dikelilingi zona kuning	Positif, berbentuk bulat dalam tandan
Mannitol Salt Agar Medium	Kuning dengan zona kuning	Positif, berbentuk bulat dalam tandan
Baird Parker Agar Medium	Hitam, berkilau, dikelilingi zona jernih 2-5 mm	Positif, berbentuk bulat dalam tandan

Tabel 2.2. Ciri khas morfologi *Pseudomonas aeruginosa* pada Media Agar Selektif dan diagnostik

Media	Ciri khas	Fluorensi morfologi koloni	Uji Oksidase di bawah cahaya ultraviolet	Pewarnaan Gram
Cetrimide Agar Medium	Umumnya kehijauan	Kehijauan	Positif	Negatif, berbentuk batang
PAF	Umumnya tidak berwarna hingga kehijauan	Kekuningan	Positif	Negatif, berbentuk batang
PAP	Umumnya kehijauan	Biru	Positif	Negatif, berbentuk batang

2.5.3.2. Uji Batas *Escherichia Coli*

Ke dalam spesimen dalam wadah yang sesuai, tambahkan sejumlah volume media FLM hingga 100,0 mL dan inkubasi. Pertumbuhan diamati, bila ada pertumbuhan kocok perlahan. Pipet berturut turut 1 mL ke dalam masing-masing wadah berisi 10 mL Media FSCM dan media FTM, campur dan inkubasi selama 12 jam sampai 24 jam. Simpan sisa media FLM.

Goreskan media dengan sengkeli dari media FLM ke permukaan media MCA (*Mac-Conkey Agar Medium*), cawan ditutup, dibalik dan diinkubasi. Jika pengamatan tidak terdapat koloni dengan pemerian yang sama seperti pada Tabel 2.3. Sampel dinyatakan bebas *E. coli*, jika ada koloni, maka ditanam pada media LEMBA (*Levine Eosin Methylen Blue Agar Medium*). Tutup cawan, dibalikkan, diinkubasi dan pertumbuhan koloni diamati (Depkes RI, 1995).

Tabel 2.3. Morfologi *Escherichia coli* pada *Mac-Conkey Agar Medium*

Morfologi koloni	Merah bata dan dikelilingi daerah yang terdiri dari endapan empedu
Pewarnaan Gram	Negatif, bentuk batang atau batang bulat

2.5.3.3. Uji Batas *Candida albicans*

Candida albicans membentuk hifa dalam media *Sabauroud Dextrosa Agar* pada suhu kamar terbentuk koloni berwarna krem dan bau seperti ragi.

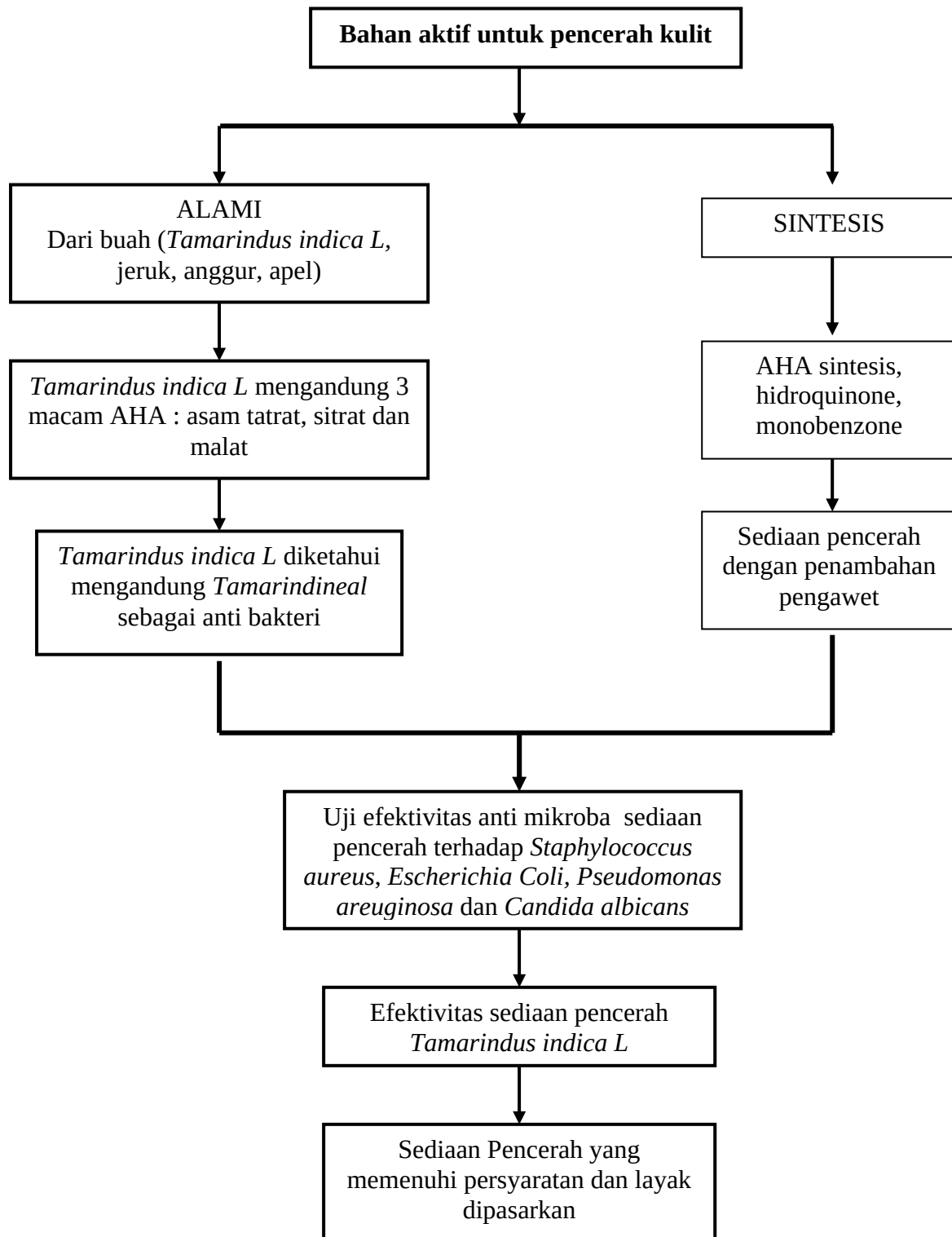
BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Senyawa *Alpha Hydroxi acid (AHA)* yang terkandung dalam *Tamarindus indica L* merupakan senyawa asam yang ditemukan dalam buah buahan yang bekerja mempercepat metabolisme kulit sehingga kulit akan tampak lebih cerah dan warna kulit lebih merata. *Tamarindus indica L* merupakan tanaman asli Indonesia yang ketersediaannya melimpah di alam, sehingga mudah didapat dan relatif murah. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini akan dicoba membuat sediaan pencerah berbahan aktif ekstrak *Tamarindus indica L*.

Bentuk sediaan yang lazim digunakan untuk sediaan kosmetika adalah bentuk krim minyak dalam air. Basis sediaan yang terdiri dari fase air merupakan media yang baik untuk pertumbuhan bakteri dan jamur, ditambah lagi iklim di Indonesia yang mempunyai kelembaban tinggi menyebabkan sediaan rentan ditumbuhi oleh bakteri dan jamur.

Selain mengandung AHA 17% ternyata *Tamarindus indica L* juga mengandung suatu antimikroba yaitu *tamarindineal*, sehingga dilakukan penelitian tentang efektivitas sediaan pencerah dengan bahan aktif ekstrak *Tamarindus indica L* terhadap kontaminan mikroba. Karena kadar *tamarindenial* sebagai antimikroba belum diketahui, maka aktivitasnya diukur berdasarkan efektivitas ekstrak *Tamarindus indica L* sebagai pencerah, apakah kadar antimikroba dalam ekstrak *Tamarindus indica L* dengan konsentrasi efektif sebagai pencerah telah cukup untuk memberi penjagaan terhadap sediaan agar tidak ditumbuhi oleh bakteri selama penggunaan.



Gambar 3.5. Kerangka konseptual

BAB IV

BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN

4.1. Bahan dan Alat

4.1.1. Bahan

Asam tartrat standar (p.a), ekstrak daging buah masak dari *Tamarindus indica* L, asam stearat, span 60, tween 80, metil paraben, propil paraben, larutan sorbitol 70%, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10230, etanol 70 %, NaCl 0,9 %, *Nutrient agar* (NA), *Sabauroud Dextrose agar* (SDA), *dapar fosfat pH 7,2*, *Media SCDA* (*Soybean Casein Digest agar Medium*), *Media FSCD* (*Fluid Soybean Casein Digest medium*), *VJA* (*Vogel Janhson Agar*), *CETA* (*Cetrimide Agar Medium*), *FTM* (*Fluid Tetrahionate Medium*), *LEMBA* (*levine Eosin Methylen Blue*), *PDA* (*Potato Dextrose Agar*).

4.1.2. Alat-alat

Alat yang diperlukan untuk penelitian ini antara lain: Viscometer VT-04, pH meter, Inkubator, neraca analitik, mikropipet, *laminar Air Flow Cabinet* (LAF), timbangan gram dan milligram.

4.2. Tahap Penelitian

4.2.1. Pembuatan Ekstrak *Tamarindus indica* L.

Pembuatan ekstrak *Tamarindus indica* L dilakukan dengan cara memaserasi daging buah *Tamarindus indica* L yang telah diperkecil ukurannya. Maserasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan menggunakan etanol 80% sebagai pelarutnya. Hasil meserasi kemudian dirotavapor untuk menghilangkan fase etanol pada maserat, penetapan kadar air yang tersisa dalam ekstrak dilakukan dengan metode gravimetri dengan syarat susut pengeringan tidak kurang dari 0,25% berat awal.

4.2.2. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Ekstrak *Tamarindus indica L*

Uji kualitatif dilakukan dengan cara mereflux 1 gram sampel dengan 20 mL etanol dalam penangas air selama 10 menit, kemudian disaring. Pada 2 mL filtrat ditambahkan Ninhidrin TS, didiamkan dalam penangas air selama beberapa menit, maka akan terbentuk warna ungu kemerahan. Uji kualitatif yang lain dilakukan dengan cara mereflux 1 gram sampel dengan 25 mL air, dipanaskan dalam penangas air selama 10 menit, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dinetralkan dengan Natrium hidroksida, Kemudian dipanaskan dengan penambahan *ferric chloride* setetes demi setetes, akan terbentuk endapan kuning.

Uji kuantitatif dilakukan dengan cara titrasi. Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan cara melarutkan 1 g ekstrak *Tamarindus indica L* dalam 50 mL air. Setiap mL Natrium hidroksida ekuivalen dengan 75,04 mg asam tartrat.

4.2.3. Pembuatan Sediaan Pencerah *Vanishing Cream*

Formulasi sediaan terdiri dari campuran bahan sebagaimana tercantum dalam Tabel 4.1

Tabel 4.1. Komposisi *vanishing cream Tamarindus indica* dalam berbagai kadar

KOMPONEN	A	B	C	D	E	F
Asam tartrat dalam ekstrak <i>Tamarindus indica L</i>	5%	6%	7%	5%	6%	7%
Asam stearat	14 g	14 g	14 g	14 g	14 g	14 g
Isopropil palmitat	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g
Metil paraben	0,1 g	0,075g	0,05g	-	-	-
Propil Paraben	0,05g	0,05g	0,05g	-	-	-
Span 60	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Sorbitol 70 %	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
Tween 80	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
Air suling ad	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g

Cara pembuatan :

Masing-masing bahan dicampur berdasarkan sifat kelarutannya. Fase minyak (asam stearat, isopropil palmitat, span 60 dan propil paraben) dilelehkan di atas penangas air pada suhu 70°C, demikian juga halnya dengan bahan yang larut dalam air (sorbitol 70% , metil paraben, tween 80) dilarutkan dalam sebagian air suling yang dipanaskan di atas penangas air pada suhu 70%.

Fase air dimasukkan ke dalam fase minyak, dibiarkan sebentar di atas penangas air sambil sekali-kali diaduk. Campuran tersebut kemudian diangkat dari penangas air, kemudian campuran fase minyak dan fase air diaduk sampai dingin dan terbentuk massa krim.

Ekstrak kental *Tamarindus indica L* dilarutkan dengan sisa air suling, kemudian larutan ekstrak *Tamarindus indica L* ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam basis krim, diaduk sampai homogen.

Campuran yang telah terbentuk ditimbang, kemudian fase air yang hilang diganti dengan penambahan air suling hingga 100 gram.

4.2.4. Karakterisasi sediaan

4.2.4.1. Organoleptis

Pengamatan secara visual karakteristik sediaan meliputi: warna, bau, konsistensi dan tekstur.

4.2.4.2. Pengukuran pH

Ditimbang sebanyak 1 gram sediaan *cream* kemudian diencerkan dengan air suling bebas CO₂ sampai 10 mL, kemudian diukur pH-nya dengan pH meter.

Pengujian dilakukan dengan terlebih dahulu mencuci elektrode dengan air suling, dibilas dan dikeringkan, dikalibrasi dengan larutan dapar pH 7, dibilas dengan air suling dan keringkan. Elektrode dimasukkan dalam sediaan, diaduk dengan *magnetik stirer*. Angka yang ditunjukkan oleh pH meter dicatat.

4.2.4.3. Penentuan Viskositas

Pengujian viskositas masing-masing formula dengan alat Viskometer VT-04. Pengujian dilakukan dengan cara sediaan dimasukkan ke dalam bob kemudian dimasukkan rotor yang sesuai pada bob dan alat dinyalakan, kemudian viskositas sediaan dibaca.

4.2.5. Uji Mikrobiologi

4.2.5.1. Pembuatan Media

Semua komponen media larut air dilarutkan dalam air suling, jika perlu dipanaskan hingga larut sempurna dan ditambahkan larutan asam klorida atau natrium hidroksida secukupnya hingga diperoleh pH yang diinginkan. pH ditetapkan pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Jika tidak dinyatakan lain media disterilkan dengan otoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C .

Pada SCDA, pH larutan setelah sterilisasi $7,3 \pm 0,2$. Pada FSCD pH larutan setelah sterilisasi $7,3 \pm 0,2$. Pada media VJA, pH sterilisasi $7,2 \pm 0,2$. Media FLM, semua komponen dilarutkan dalam air, pH larutan setelah sterilisasi $6,9 \pm 0,2$. Media CETA pH larutan setelah sterilisasi $7,2 \pm 0,2$. Media FSCM dipanaskan diatas uap air mengalir selama 15 menit, tidak boleh disterilkan, pH akhir $7,0 \pm 0,2$. Media *Mac-Conkey* pH sterilisasi $7,1 \pm 0,2$. Media LEMBA pH sterilisasi $7,1 \pm 0,2$. Semua komponen dilarutkan dalam air.

4.2.5.2. Pembuatan Dapar Fosfat pH 7,2

Pembuatan dapar fosfat pH 7,2 dilakukan dengan melarutkan 34,0 g kalium dihidrogen fosfat P dalam 175 mL Natrium hidroksida 1N sampai pH $7,2 \pm 0,1$, kemudian ditambahkan air suling sampai 1000 mL. Larutan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu $2-8^\circ\text{C}$. Sebelum digunakan 1 bagian volume larutan diencerkan dahulu dengan 800 bagian air, kemudian disterilkan 121°C selama 15 menit.

4.2.5.3. Penyiapan Sampel

Sampel dianalisis sesegera mungkin. Jika diperlukan penyimpanan, maka disimpan dalam suhu kamar, tidak disimpan di inkubator ataupun lemari pendingin. Wadah sampel diperiksa sebelum dibuka, setelah itu permukaan wadah sampel didesinfeksi dengan campuran etanol 80% (v/v) dan HCl 1% (v/v), permukaan dikeringkan dengan kasa steril sebelum dibuka dan dipindahkan isinya (Modden, 1987).

Sebelum sediaan krim dianalisis, sampel diambil dan ditimbang secara aseptik sebanyak 2,00 g dan dimasukkan ke dalam tabung tertutup yang berisi 1 mL tween steril, diaduk dan ditambahkan inokulum mikroba uji 0,01mL. Kemudian ditambahkan volumenya sampai 10 mL dengan larutan dapar fosfat pH 7,2.

4.2.5.4. Penyiapan inokulum bakteri uji

Penyiapan inokulum bakteri uji dilakukan dengan memasukkan satu Ose biakan agar miring yang berasal dari kultur persediaan ke dalam media agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam. Ke dalam tabung ditambahkan 2 mL NaCl 0,9% steril, kemudian disuspensikan. Sebanyak 2 mL suspensi diencerkan dengan larutan NaCl 0,9% steril sampai diperoleh transmittan 25%, kemudian diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda = 580$ nm dan dengan larutan NaCl 0,9% sebagai blanko (Depkes RI, 1995).

4.2.5.5. Uji Pendahuluan

Pada uji batas mikroba berlaku ketentuan bahwa sediaan yang diperiksa tidak menghambat pertumbuhan mikroba. Sediaan yang akan di uji diencerkan kemudian diinokulasi secara terpisah dengan biakan *Staphylococcus aureus*,, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Candida albicans*.

Sediaan uji diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,2 kemudian sebanyak 1,0 mL enceran tersebut diinokulasikan ke dalam media *Nutrien Agar*. Jika terdapat pertumbuhan mikroba dilakukan modifikasi dalam pengujian dengan meningkatkan pengenceran sediaan yang diperiksa atau menambah *inaktivator*

yang cocok dalam jumlah yang cocok atau gabungan dari modifikasi cara 1 dan 2 sedemikian rupa, sehingga terjadi pertumbuhan.

Jika penambahan inaktivator dan peningkatan volume masih tidak dapat menumbuhkan bakteri *viabel* dan sediaan tidak dapat disaring secara aseptik dengan membran steril penyaring bakteri, dapat disimpulkan bahwa kegagalan pertumbuhan bakteri disebabkan oleh daya bakteriasid sediaan.

4.2.5.6. Penapisan

Penapisan dilakukan dengan memasukkan 1 mL sampel dalam botol tertutup yang berisi media *Nutrien agar* cair, kocok sampai tercampur, kemudian tanam dengan metode tuang kocok. Untuk jamur ditanam pada *Sabouroud Dextrose Agar*. Diinkubasi pada $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. Pertumbuhan kuman diamati pada hari ke-1, 7, 14, 21 dan ke-28.).

4.2.5.7. Penetapan angka mikroba

Disiapkan cawan petri yang berisi *Nutrien Agar* dan diberi label pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-6} . Dibuat pengenceran mikroba uji dengan larutan dapar fosfat pada perbandingan 1: 10, sampai didapat pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-6} . Dari tiap pengenceran diambil 1,0 mL dan ditanam pada media *Nutrien Agar*. Dihomogenkan dan diinkubasi pada $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam untuk bakteri. Dihitung koloni dalam lempeng yang berisi 30-300 koloni. Kedua lempeng dinyatakan dalam rata-rata jumlah bakteri tiap gram sampel dan dikalikan dengan pengenceran (*Aerob Plate Count* atau APC/gram (mL) sampel (Depkes RI, 1995).

Untuk jamur ditanam pada *Sabouroud Dextrose Agar* dan diinkubasi pada suhu $20-25^{\circ}\text{C}$.

4.2.5.8. Identifikasi Mikroba

Identifikasi dilakukan pada koloni yang tumbuh dengan mengambil satu koloni pada media *Nutrien Agar* dan *Sabouroud Dextrose Agar* kemudian digesekkan pada media selektif. *Staphylococcus aureus* menggunakan media *Maltosa salt Agar*, *Escherichia coli* pada media *Mac-Conkey Agar*, *Pseudomonas*

aeruginosa dalam media *Pseudomonas Agar*, dan *Candida albicans* membentuk hifa pada media *Sabauroud Dextrose agar* pada suhu kamar, terbentuk koloni berwarna krem dan bau seperti ragi. Morfologi masing-masing bakteri dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Morfologi Bakteri pada Media Agar Selektif

Nama Bakteri	Media Selektif	Morfologi koloni	Pewarnaan Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Maltosa salt Agar</i>	Kuning dengan zona kuning	Positif, bentuk bulat dalam tandang
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas Agar</i>	Kehijauan	Positif
<i>Escherichia coli</i>	<i>Mac-Conkey Agar</i>	Merah bata dan dikelilingi daerah yang terdiri dari endapan empedu	Negatif, berbentuk batang atau batang bulat.

4.3. Analisa Data

Untuk mengetahui perbedaan efektivitas antimikroba antar masing-masing formula dilakukan uji analisis ANOVA dengan rancangan faktorial. Uji ini digunakan untuk mengetahui efek beberapa variabel. Variabel dinyatakan dengan faktor A dan B. Katagori dalam faktor disebut level, dapat diperoleh tiga macam kesimpulan yaitu : *main effect*, *simple effect* dan *interaction effect*

Tabel Anova faktorial

	Sum of squares (SS)	Df	Mean square (MS)	F	Ftabel.
A	SS_A	$a-1$	$MS_T = SS_T/a-1$	MS_T/MS_E	
B	SS_B	$b-1$	$MS_B = SS_B/b-1$	MS_B/MS_E	
AB	SS_T	$(a-1)(b-1)$	$MS_{AB} = SS_E/(a-1)(b-1)$	MS_{AB}/MS_E	
Treatment		$ab-1$			
Residual error		$ab(n-1)$	$MS_E = SS_E/ab(n-1)$		
TOTAL	SS	$abn-1$			

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Ekstraksi Daging Buah Asam Jawa (*Tamarindus indica L.*)

Daging buah asam jawa sebanyak 6 Kg telah dipilah dan dipisahkan bijinya serta dipotong kecil-kecil, menghasilkan daging buah *Tamarindus indica L* yang siap diekstraksi sebanyak 5,040 Kg, selanjutnya dimaserasi dengan etanol 80% sebanyak 3 kali. Diperoleh ekstrak kental sebanyak 3,778 Kg.

5.2 Pengukuran kadar air Ekstrak *Tamarindus indica L* dengan metode Gravimetri

Pengukuran kadar air dilakukan dengan mengeringkan 10 gram ekstrak pada suhu 105°C selama 5 jam, dilanjutkan dengan pengeringan selama 1 jam sampai selisih kadar air tidak lebih dari 0,25%. Hasil pengamatan susut pengeringan ekstrak *Tamarindus indica L* dapat dilihat pada Tabel 5.1

Tabel 5.1. Hasil pengamatan replikasi susut pengeringan ekstrak *Tamarindus indica L*

Berat sebelum pemanasan	Parameter	Setelah 5 jam	Setelah 6 jam	Setelah 7 jam	Setelah 8 jam	Setelah 9 jam
10,2723 g	Berat	9,0277 g	8,8980 g	8,777 g	8,6689 g	*
	Susut pengeringan	12,12%	13,38%	14,38%	15,61%	
	Selisih	-	1,26%	1,17%	1,07%	
10,1181 g	Berat	9,0181 g	8,8572 g	8,7100g	8,604 g	8,4636 g
	Susut pengeringan	10,87%	12,46%	13,92%	14,96%	16,35%
	Selisih	-	1,59%	1,46%	1,04%	1,39%
10,2517 g	Berat	9,0185 g	8,8725 g	8,7277g	8,6139 g	8,4863 g
	Susut pengeringan	12,08%	13,45%	14,87%	15,97%	17,22%
	Selisih	-	1,37%	1,42%	1,1%	1,25%
9,9004 g	Berat	8,7493 g	8,6057 g	8,4399g	8,329 g	8,2057 g
	Susut pengeringan	11,63%	13,08%	14,75%	15,87	18,18%
	Selisih	-	1,42%	1,62%	1,12%	2,95%

Keterangan : Tanda * tidak ada data, disebabkan oleh pecahnya wadah

Pada pengukuran susut pengeringan ekstrak setelah 8 jam, selisih kadar air dengan 7 jam setelah pengeringan sebesar 1,08%

Dari data susut pengeringan yang diperoleh, ternyata selisih kadar air ekstrak *Tamarindus indica L* setelah pengeringan selama 5 jam dan diikuti berturut-turut pengeringan pada jam ke-6, 7, 8 dan 9 belum dapat memenuhi standar Farmakope Indonesia IV yaitu selisih antara dua penimbangan terakhir tidak lebih dari 0,25%. Hal ini disebabkan sifat ekstrak yang sangat higroskopis, karena mengandung glukosa.

5.3 Hasil Uji Kualitatif Ekstrak *Tamarindus indica L*

Hasil uji kualitatif ekstrak dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil uji kualitatif ekstrak *Tamarindus indica L*

Macam Uji	Hasil	Keterangan
Reaksi warna dengan ninhidrin	+	Terbentuk warna merah keunguan
Reaksi pembentukan endapan dengan FeCl_3 1%	+	Terbentuk endapan warna kuning

Kedua uji kualitatif terhadap ekstrak *Tamarindus indica L* memberikan hasil yang positif, dengan demikian membuktikan bahwa dalam ekstrak *Tamarindus indica L* terkandung senyawa-senyawa asam (AHA) (Anonim, 1993).

5.4 Hasil Penetapan Kadar Asam Total Dihitung sebagai AsamTatrat dalam Ekstrak *Tamarindus indica L*

5.4.1. Perhitungan Kadar Total Asam sebagai Asam Tatrat dalam Ekstrak *Tamarindus indica L*

Hasil replikasi titrasi ekstrak *Tamarindus indica L* dengan NaOH 0,9980N dapat dilihat pada Tabel 5.3

Tabel 5.3 Hasil titrasi sampel (ekstrak *Tamarindus indica L*) dengan larutan NaOH 0,9980 N

Penimbangan Sampel (g)	NaOH yang dibutuhkan (ml)	Kandungan asam tartrat (mg)	Kadar asam tartrat (% b/b)
1,0346	1,90	142,29	13,75
0,9907	1,80	134,80	13,61
0,9968	1,85	138,55	13,85
1,0047	1,85	138,53	13,79
1,0079	1,85	138,50	13,74
1,0115	1,85	138,50	13,69
1,0120	1,90	142,30	14,06
1,0120	1,90	142,30	14,06
1,0030	1,85	138,50	13,81
Kadar asam tartrat rata-rata			13,82 ± 0,31

Dari hasil di atas diperoleh kadar asam tartrat dalam sampel rata-rata sebesar $13,82 \pm 0,31$ % (b/b). Kadar total asam yang dihitung sebagai asam tartrat yang diperoleh tersebut lebih rendah dibanding dengan kadar yang terdapat dalam buku *ASEAN Herbal* yaitu 17%. Perbedaan kandungan total asam tersebut disebabkan oleh masih tingginya kadar air dalam ekstrak dan juga perbedaan sumber daging buah *Tamarindus indica L* yang diekstraksi.

5.4.2 Titrasi Standar Asam Tartrat

Dilakukan untuk menentukan persen rekoverti pada penetapan kadar kandungan asam total yang dihitung sebagai asam tartrat dalam ekstrak *Tamarindus indica L* di atas. Digunakan standar asam tartrat yang dilarutkan dalam air suling sampai volume tertentu, kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,9980 N yang sudah dibuat. Satu mL NaOH yang dibutuhkan untuk titrasi setara dengan 75,04 mg asam tartrat.

Hasil titrasi standar asam tartrat dapat dilihat pada tabel 5.4

Tabel 5.4 Hasil titrasi standar asam tartrat dengan NaOH 0,9980 N

Penimbangan Std. As. Tartrat (mg)	NaOH yg dibutuhkan (ml)	Kandungan asam tartrat (mg)	Rekoveri (%)
151,4	2,05	153,83	101,59
150,3	2,15	161,34	107,32
150,0	2,10	157,58	105,07
Rata-rata			104,60 ± 2,89

Dari hasil di atas diperoleh persen rekoveri sebesar 104,60 ± 2,89 %. Menurut literatur, untuk bahan alam persen rekoveri yang dipersyaratkan adalah antara 80-120%.

5.5 Pembuatan Sediaan Pencerah Kulit

Pada uji pendahuluan terhadap masing-masing konsentrasi tanpa basis, ternyata ekstrak *Tamarindus indica L* tanpa pengawet sudah dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* maupun *Candida albican*, sehingga pada percobaan selanjutnya hanya diteliti formul. Komponen sediaan *vanishing cream* dapat dilihat pada Tabel 5.5

Tabel 5.5 Komponen sediaan *vanishing cream Tamarindus indica L*

KOMPONEN	A	B	C	D	E	F
Ekstrak asam jawa	36,18g	43,42g	50,65g	36,18g	43,42g	50,65g
Asam Stearat	14 g	14 g	14 g	14 g	14 g	14 g
Isopropil palmitat	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g
Metil paraben	0,1 g	0,075g	0,05g	-	-	-
Propil Paraben	0,05g	0,05g	0,05g	-	-	-
Span 60	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Sorbitol 70 %	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
Tween 80	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
Aquadest ad	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g

Keterangan tabel 5.5 : Pada sediaan D, E dan F diuji tanpa menggunakan basis terlebih dahulu untuk mengetahui konsentrasi optimum dari ekstrak *Tamarindus indica L* yang efektif sebagai antimikroba.

Selanjutnya, sediaan pencerah kulit *vanishing cream* dengan bahan aktif *Tamarindus indica L* dibuat hanya dalam satu komposisi yaitu sediaan pencerah *Tamarindus indica L* yang mengandung asam tatarat 7 % tanpa penambahan bahan pengawet. Konsentrasi tersebut dipilih karena dianggap sebagai konsentrasi optimum yang efektif sebagai antibakteri dan anti fungi sekaligus mempunyai daya yang efektif terhadap pencerah kulit. Pemilihan didasarkan atas hasil orientasi pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya.

5.6 Hasil Evaluasi Mutu dan Stabilitas Fisik Sediaan

5.6.1 Hasil Pengujian Organoleptis

Hasil pengamatan organoleptis sediaan yang meliputi bentuk, warna, bau, sifat pada saat pemakaian, kesan saat dan setelah pengolesan serta kemudahan pencucian dapat dilihat pada Tabel 5.6

Tabel 5.6 Tabel pengamatan organoleptis sediaan pencerah *vanishing cream* *Tamarindus indica L* dengan kandungan asam tartrat 7%

Macam pengamatan	Hari ke-1	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-21	Hari ke-28
Bentuk	Semipadat	Semipadat	Semipadat	Semipadat	Semipadat
Tekstur	Halus	Halus	Halus	Halus	Halus
Warna	Coklat	Coklat	Coklat	Coklat	Coklat
Bau	Asam	Asam	Asam	Asam	Asam
Kesan saat dioleskan	Dingin, sedikit lengket	Dingin, sedikit lengket	Dingin, sedikit lengket	Dingin, sedikit lengket	Dingin, sedikit lengket
Kemudahan pencucian	Mudah dicuci air	Mudah dicuci air	Mudah dicuci air	Mudah dicuci air	Mudah dicuci air

Dari hasil pengamatan organoleptis pada hari ke-1, 7, 14, 21 dan 28 setelah pembuatan, tidak ada perubahan yang bermakna pada sediaan, hal tersebut menunjukkan bahwa sediaan *vanishing cream Tamarindus indica L* yang mengandung asam tartrat 7% stabil secara organoleptis selama penyimpanan.

5.6.2 Pengukuran Viskositas Sediaan

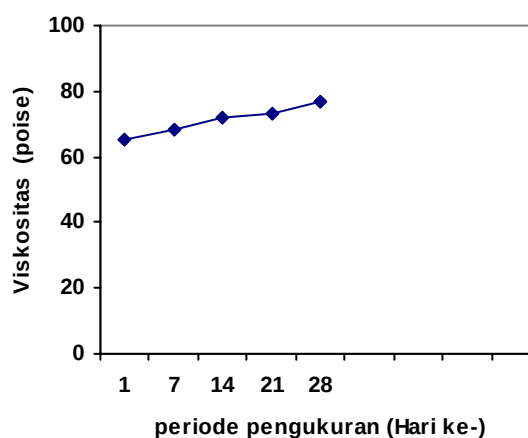
Pengukuran viskositas sediaan dilakukan pada hari ke-1, 7, 14, 21 dan 28 setelah pembuatan, dengan menggunakan Viskometer VT-04 pada suhu kamar (26 – 30°C)

Hasil pengukuran viskositas sediaan dapat dirangkum pada Tabel 5.7

Tabel 5.7 Hasil pengukuran viskositas sediaan krim yang diamati pada hari ke-1, 7, 14, 21 dan 28 setelah pembuatan

Hari Ke-	Sediaan pencerah (Formula F)			
	Replikasi			Rerata
	I	II	III	
1	60	65	70	65,00±5,00
7	65	70	70	68,33±2,89
14	70	70	75	71,67±2,89
21	75	70	75	73,33±2,89
28	80	75	75	76,67±2,89

Hasil pengukuran di atas dapat digambarkan dalam kurva hubungan antara harga rata-rata viskositas sediaan dengan periode pengukuran sebagai berikut :



Gambar 5.1 Kurva hubungan antara harga rata-rata viskositas sediaan dengan periode pengukuran.

Dari analisa yang dilakukan didapatkan hasil bahwa $F_{hitung} = 5,21$ lebih besar dari $F_{tabel} = 3,48$, sehingga H_a diterima.

H_a diterima : ada perbedaan bermakna viskositas selama periode penyimpanan

Selanjutnya dilakukan uji LSD untuk mengetahui kapan terjadi perbedaan viskositas yang bermakna. Dari uji LSD diketahui bahwa terjadi perbedaan viskositas yang bermakna antara hari ke-1 dengan hari ke-7, 14 dan 21. Pada hari ke-28 juga terjadi perbedaan bermakna viskositas sediaan. Perbedaan ini disebabkan karena terjadinya pengurangan kadar air akibat penguapan sediaan selama penyimpanan. Sedangkan pada periode pengukuran setelah hari ke-7 sampai ke-21 tidak terjadi perbedaan yang bermakna dari viskositas sediaan, sehingga dapat dikatakan viskositas sediaan relative tidak stabil selama penyimpanan.

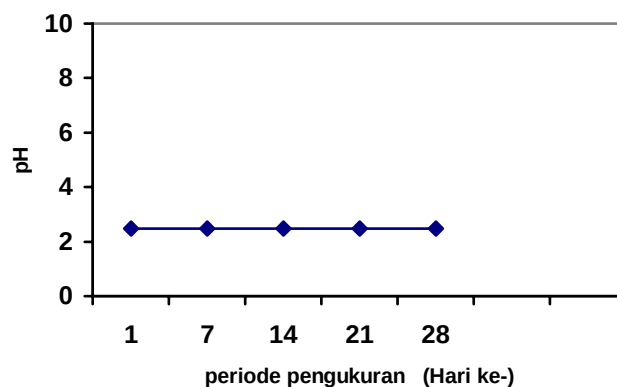
5.6.3 Pengukuran pH Sediaan

Pengukuran pH sediaan krim dilakukan pada hari ke-1, 7, 14, 21 dan 28 setelah pembuatan, dengan menggunakan pH meter pada suhu kamar ($26-30^{\circ}\text{C}$). Hasil pengukuran pH sediaan dapat dirangkum dalam Tabel 5.8

Tabel 5.8 Hasil pengukuran pH sediaan krim yang diamati pada hari ke-1, 7, 14, 21 dan 28

Hari ke-	Sediaan pencerah (Formula F)			
	Replikasi			Rerata
	I	II	III	
1	2,48	2,50	2,51	2,49±0,02
7	2,48	2,50	2,51	2,49±0,02
14	2,46	2,51	2,48	2,48±0,01
21	2,46	2,49	2,50	2,48±0,01
28	2,46	2,49	2,49	2,48±0,01

Hasil pengukuran di atas dapat digambarkan dalam kurva hubungan antara harga rata-rata pH sediaan dengan periode pengukuran sebagai berikut :



Gambar 5.2 Kurva hubungan harga rata-rata pH sediaan dengan periode pengukuran

Dari analisa data yang dilakukan didapatkan hasil bahwa $F_{hitung} = 0,527$ lebih kecil dari $F_{tabel} = 3,48$, sehingga H_a tidak diterima.

H_a tidak diterima : tidak ada perbedaan bermakna pada pH sediaan selama periode penyimpanan.

Pada hari ke-1, 7, 14, 21 dan 28 setelah pembuatan tidak ada perubahan yang bermakna pada pH sediaan, hal tersebut menunjukkan bahwa sediaan *vanishing*

cream Tamarindus indica L yang mengandung AHA 7% tidak mengalami perubahan pH selama penyimpanan.

5.7 Hasil Evaluasi Efektivitas Anti Bakteri Sediaan Pencerah Kulit

5.7.1 Data Hasil Pengamatan

Sampel A, B, C, D, E dan F tanpa basis (hanya bahan aktif dan pengawet saja) diinokulasi dengan bakteri uji . Setelah diinkubasi pada suhu 30-35 °C selama 24 jam tidak ada pertumbuhan bakteri di semua sampel yang telah diinokulasi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*. Dengan hasil yang didapat maka diketahui bahwa sediaan tanpa pengawet (D, E dan F) sudah mampu untuk menghambat pertumbuhan mikroba, untuk selanjutnya sediaan tanpa pengawet saja yang diuji efektivitas antimikrobanya. Pengamatan pertumbuhan bakteri dan jamur untuk menentukan efektivitas antimikroba yang terkandung dalam ekstrak *Tamarindus indica L* dilakukan pada hari ke-1, 7, 14, 21 dan 28. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 5.9, Tabel 5.10, Tabel 5.11, Tabel 5.12 dan Tabel 5.13

Tabel 5.9. Hasil pengamatan pertumbuhan koloni pada ekstrak *Tamarindus indica L* (pada konsentrasi efektif sebagai pencerah kulit) dengan kontaminan *Staphylococcus aureus*

Hari Ke-	Ekstrak <i>Tamarindus indica L</i> dengan kontaminan <i>Staphylococcus aureus</i>											
	Kandungan Asam tartrat 5% (Formula D)				Kandungan Asam tartrat 6%(Formula E)				Kandungan Asam tartrat 7% (Formula F)			
	Replikasi			Rerata	Replikasi			Rerata	Replikasi			Rerata
	I	II	III		I	II	III		I	II	III	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabel 5.10 Hasil pengamatan pertumbuhan koloni ekstrak *Tamarindus indica L* (pada konsentrasi efektif sebagai pencerah kulit) dengan kontaminan *Escherichia coli*

Hari Ke-	Ekstrak <i>Tamarindus indica L</i> dengan kontaminan <i>Escherichia coli</i>											
	Kandungan Asam tartrat 5% (Formula D)				Kandungan Asam tartrat 6% (Formula E)				Kandungan Asam tartrat 7% (Formula F)			
	Replikasi			Rerata	Replikasi			Rerata	Replikasi			Rerata
	I	II	III		I	II	III		I	II	III	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabel 5.11 Hasil pengamatan pertumbuhan koloni ekstrak *Tamarindus indica L* (pada konsentrasi efektif sebagai pencerah kulit) dengan kontaminan *Pseudomonas aeruginosa*

Hari Ke-	Ekstrak <i>Tamarindus indica L</i> dengan kontaminan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>											
	Kandungan Asam tartrat 5% (Formula D)				Kandungan Asam tartrat 6% (Formula E)				Kandungan Asam tartrat 7% (Formula F)			
	Replikasi			Rerata	Replikasi			Rerata	Replikasi			Rerata
	I	II	III		I	II	III		I	II	III	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabel 5.12 Hasil pengamatan pertumbuhan koloni ekstrak *Tamarindus indica L* (pada konsentrasi efektif sebagai pencerah kulit) dengan kontaminan *Candida Albicans*

Hari Ke-	Ekstrak <i>Tamarindus indica L</i> cream dengan kontaminan <i>Candida Albicans</i>											
	Kandungan Asam tartrat 5% Formula D)				Kandungan Asam tartrat 6% (Formula E)				Kandungan Asam tartrat 7% (Formula F)			
	Replikasi			Rerata (10 ⁶)	Replikasi			Rerata (10 ³)	Replikasi			Rerata (10 ³)
	I (10 ⁶)	II (10 ⁶)	III (10 ⁶)		I (10 ³)	II (10 ³)	III (10 ³)		I (10 ³)	II (10 ³)	III (10 ³)	
1	116	132	104	117,33	234	198	265	232,33	87	85	90	87,33
7	86	99	90	91,66	8	6	11	8,33	0	0	0	0
14	78	88	87	84,33	1	0	1	0,67	0	0	0	0
21	77	75	84	78,66	0	0	0	0	0	0	0	0
28	75	74	79	76	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabel 5.13 Hasil pengamatan pertumbuhan koloni sediaan pencerah *vanishing cream Tamarindus indica L* dengan kandungan asam tartrat 7%

Hari Ke-	Sediaan <i>Tamarindus indica L</i> dalam Basis <i>Vanishing Cream</i> (formula F)															
	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Candida albicans</i>			
	Replikasi			Rerata	Replikasi III			Rerata	Replikasi			Rerata	Replikasi			Rerata
	I	II	III		I	II	III		I	II	III		I (10 ³)	II (10 ³)	III (10 ³)	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55	47	64	55,33
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan :

1. Angka “0” menunjukkan tidak ada pertumbuhan koloni pada masa pengujian.
2. Pada sediaan dengan kandungan asam tartrat 5% dilakukan pengenceran *Candida albicans* hingga 10⁶, kemudian untuk mengembalikan jumlah koloni yang tumbuh dikalikan dengan pengenceran (*Aerob Plate Count* atau APC/gram (mL) sampel).

3. Pada sediaan dengan kandungan asam tartrat 6% dan 7% dilakukan pengenceran *Candida albicans* hingga 10^3 , kemudian untuk mengembalikan jumlah koloni yang tumbuh dikalikan dengan pengenceran (*Aerob Plate Count* atau APC/gram (mL) sampel).
4. Satuan untuk pertumbuhan koloni adalah APC/mL sampel.

5.7.2 Hasil Analisis Data

Pada Formula D tanpa Basis

Pada ekstrak *Tamarindus indica L* yang diinokulasi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* sama sekali tidak terjadi pertumbuhan koloni, dengan demikian ekstrak *Tamarindus indica L* dengan kandungan asam tartrat 5% sudah dapat memberi penjagaan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*.

Terjadi perbedaan pertumbuhan koloni *Candida albicans* yang bermakna antara ekstrak *Tamarindus indica L* yang mengandung asam tartrat 5% (Formula D tanpa basis) dengan ekstrak *Tamarindus indica L* konsentrasi 6% dan 7% (formula E dan F tanpa basis). Pada ekstrak *Tamarindus indica L* yang mengandung asam tartrat 6% dan 7% tidak terjadi perbedaan pertumbuhan yang bermakna. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak *Tamarindus indica L* yang mengandung asam tartrat 5% belum dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* hingga hari ke-28

Pada ekstrak *Tamarindus indica L* dengan konsentrasi asam tartrat 6% dan 7% (Formula E dan F tanpa basis) diamati pada hari ke1, 7, 14, 21 dan 28

Selanjutnya dilakukan uji LSD untuk mengetahui kapan terjadi perbedaan pertumbuhan koloni yang bermakna pada sampel dengan kontaminan *Candida albicans*. Dari uji LSD diketahui bahwa terjadi perbedaan pertumbuhan yang bermakna antara hari ke-1 dengan hari ke-7, 14, 21 dan 28. Sedangkan pada periode pengukuran setelah hari ke-7 sampai ke-28 tidak terjadi perbedaan yang bermakna dari pertumbuhan koloni. Jadi, dapat dikatakan bahwa setelah hari ke-7 pertumbuhan koloni relatif stabil sampai hari ke-28.

Pengamatan pertumbuhan bakteri dan jamur pada ekstrak *Tamarindus indica* L dengan kandungan asam tartrat 7% dalam basis *Vanishing Cream*

Tidak terjadi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* pada sediaan pencerah *vanishing cream Tamarindus indica* L dengan kandungan asam tartrat 7% (formula F).

Pada sediaan pencerah *vanishing cream Tamarindus indica* L dengan kandungan asam tartrat 7% yang diinokulasi dengan *Candida albicans* terjadi pertumbuhan untuk itu dilakukan analisa data. Dari analisa data yang dilakukan didapatkan hasil bahwa $F_{hitung} = 126,97$ lebih besar dari $F_{tabel} = 3,48$, sehingga H_a diterima.

H_a diterima : ada perbedaan bermakna pertumbuhan bakteri selama periode penyimpanan

Selanjutnya dilakukan uji LSD untuk mengetahui kapan terjadi perbedaan pertumbuhan yang bermakna. Dari uji LSD diketahui bahwa terjadi perbedaan pertumbuhan yang bermakna antara hari ke-1 dengan hari ke-7, 14, 21 dan 28. Sedangkan pada periode pengukuran setelah hari ke-7 sampai ke-28 tidak terjadi perbedaan yang bermakna dari pertumbuhan koloni. Jadi, dapat dikatakan bahwa setelah hari ke-7 tidak ada pertumbuhan yang bermakna pada sediaan yang berarti sediaan pencerah *vanishing cream Tamarindus indica* L dengan kandungan asam tartrat 7% (Formula F) dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* hingga hari terakhir pengujian (hari ke-28).

Syarat Farmakope Indonesia IV, jumlah bakteri viabel pada hari ke-14 berkurang hingga tidak lebih dari 0,1% dari jumlah awal dan jumlah tiap mikroba uji selama hari tersisa dari 28 hari pengujian adalah tetap. Menilik syarat di atas, maka sediaan *vanishing cream* dengan kandungan asam tartrat 7% (Formula F) efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur.

BAB VI

PEMBAHASAN

Ekstraksi *Tamarindus indica L* sebagai langkah awal penelitian ini dilakukan dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 80%. Dipilih pelarut etanol 80% karena senyawa AHA (sebagai senyawa utama yang dikehendaki terekstraksi) bersifat polar dan senyawa-senyawa yang bersifat polar lebih selektif terekstraksi dengan pelarut campuran etanol – air dibandingkan dengan pelarut air murni. Selain itu penggunaan pelarut etanol-air menyebabkan beberapa senyawa lain yang bersifat non polar juga ikut terekstraksi dalam jumlah tertentu. Hal ini menguntungkan, karena senyawa non polar yang terekstraksi seperti: vitamin A, B dan flavonoid bersifat nutritif bagi kulit sehingga dapat membantu proses perbaikan kondisi kulit.

Setelah diperoleh ekstrak, tahapan selanjutnya adalah dilakukan uji kualitatif terhadap ekstrak *Tamarindus indica L*, yaitu antara lain dengan reaksi warna menggunakan pereaksi ninhidrin dan reaksi pembentukan endapan dengan FeCl_3 1%. Kedua uji kualitatif yang dilakukan memberikan hasil yang positif, yaitu pada reaksi warna dengan ninhidrin, ekstrak *Tamarindus indica L* memberikan warna merah keunguan. Sedangkan pada reaksi dengan FeCl_3 1% terbentuk endapan berwarna kuning. Dari hasil pengujian tersebut, membuktikan bahwa dalam ekstrak *Tamarindus indica L* terkandung senyawa-senyawa asam (AHA) (Anonim,1993).

Selanjutnya dilakukan uji kuantitatif terhadap ekstrak untuk menentukan kadar kandungan asam total dinyatakan sebagai asam tartrat dalam ekstrak. Uji ini dilakukan dengan metode titrasi asam basa menggunakan titran NaOH 1 N dan indikator fenolftalein (PP). Metode ini merupakan metode paling sederhana dan mudah dilakukan, tetapi memiliki keakuratan yang rendah. Dari hasil titrasi diperoleh kadar asam tartrat dalam ekstrak sebesar 13,82 % dengan nilai persen rekoverti sebesar 104,60%. Nilai persen rekoverti yang diperoleh ini lebih dari 100%, padahal pada umumnya persen rekoverti untuk bahan alam selalu dibawah 100%, hal tersebut terjadi karena kurang akuratan penulis dalam mengamati *end point*.

Penetapan kadar asam total yang dinyatakan sebagai asam tartrat dalam *Tamarindus indica L* bertujuan untuk mengetahui jumlah ekstrak *Tamarindus indica L* yang perlu ditambahkan dalam formulasi sediaan untuk mencapai konsentrasi pencerahan kulit yang aman dan efektif. Selanjutnya diteliti apakah jumlah ekstrak *Tamarindus indica L* yang efektif terhadap pencerahan kulit tersebut juga efektif sebagai antimikroba.

Formulasi sediaan pencerah dengan bahan aktif *Tamarindus indica L* dibuat dalam kandungan asam tartrat sebesar 7% (formula F), karena pada konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi efektif dan aman bagi pencerahan kulit dan berdasarkan orientasi yang dilakukan sebelumnya, dapat memberi hambatan terhadap pertumbuhan mikroba pada sediaan.

Pada uji efektivitas antimikroba sediaan *vanishing cream Tamarindus indica L*, dilakukan dengan penambahan inokulum bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans* pada sediaan dengan bahan aktif ekstrak *Tamarindus indica L* dengan berbagai konsentrasi yang efektif untuk pencerahan kulit.

Inokulum bakteri yang dipakai adalah bakteri dengan transmittan 25%, karena pada kekeruhan tersebut diharapkan pertumbuhan bakteri berada pada fase eksponential time, yaitu fase dimana antara bakteri tumbuh optimal. Sebelum pengujian dilakukan, terlebih dahulu dibuat biakan persediaan segar mikroba yang akan digunakan. Biakan bakteri diinokulasi pada suhu 30-35°C selama 24 jam. Untuk memanen biakan bakteri dan *Candida albican* digunakan larutan NaCl P 0,9% steril dengan mencuci permukaan pertumbuhan dan hasil cucian dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilakukan pengenceran dengan larutan NaCl P 0,9% hingga didapat transmittan 25%.

Pengujian pertama, sampel A, B, C, D, E dan F tanpa basis (hanya bahan aktifnya saja) diinokulasi dengan bakteri uji dengan angka mikroba awal 100.000per mL, kemudian ditanam dalam media *Nutrient Agar* dengan metode tuang kocok. Setelah diinkubasi pada suhu 30-35 °C selama 24 jam tidak ada pertumbuhan bakteri di semua sampel yang telah diinokulasi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*, begitu pula pada pengamatan hari ke-7, 14, 21 dan 28 setelah inokulasi. Dengan hasil yang didapat maka diketahui bahwa sediaan tanpa pengawet (D, E dan F) sudah mampu untuk menghambat pertumbuhan bakteri, untuk

selanjutnya sediaan tanpa pengawet saja yang diuji efektivitas antimikrobanya. Jumlah angka mikroba awal yang digunakan kemudian ditingkatkan sampai 1000.000 per mL, terlihat pertumbuhan pada fungi *Candida albicans* pada hari pertama pengamatan. Pertumbuhan tersebut terjadi pada sediaan E dan F tanpa basis, tetapi tetap tidak terjadi pertumbuhan pada sediaan dengan inokulum *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*. Penelitian dilanjutkan dengan menambahkan inokulum 0,1 mL dalam 20 mL sediaan (sesuai syarat Farmakope IV). Pada keadaan tersebut, tetap tidak terjadi pertumbuhan pada bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*. Pada *Candida albicans* terjadi pertumbuhan yang sangat rapat, sehingga jumlah jamur yang tumbuh tidak dapat teramati. Langkah selanjutnya dilakukan pengamatan pada hari 7, 14, 21 dan 28 yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan sama sekali pada ketiga bakteri. Pengujian dengan jamur *Candida albicans* dilakukan pengenceran sampai jamur yang tumbuh pada hari pertama antara 100.000-1000.000 koloni per mL. Pada pengamatan hari ketujuh pada *Candida albicans* didapat penurunan jumlah bakteri yang bermakna pada sediaan E dan F tanpa basis, tetapi tidak ada penurunan yang bermakna pada sediaan D tanpa basis. Pada pengamatan hari ke 14, sudah tidak ada pertumbuhan sama sekali pada sediaan F tanpa basis dan terdapat sedikit pertumbuhan pada sediaan E tanpa basis. Pertumbuhan yang terjadi pada sediaan E tanpa basis di hari ke-14 masih lebih dari 0,1 % sehingga belum memenuhi syarat Farmakope Indonesia IV. Berdasarkan hal tersebut maka hanya dipilih sediaan F untuk diformulasi dalam basis *vanishing cream*. Dari hasil pengamatan didapat pertumbuhan *Candida albicans* pada hari pertama lebih sedikit yaitu $55,33 \times 10^3$ dibanding dengan pertumbuhan jamur pada sampel F tanpa basis *vanishing cream* yaitu 87×10^3 , hal ini terjadi karena jumlah fase air pada basis lebih sedikit dibandingkan kontrol F. Seperti diketahui bahwa antimikroba diperlukan untuk penjagaan pertumbuhan mikroba pada fase air saja, sehingga dengan jumlah air yang sedikit dan dengan jumlah ekstrak yang sama dapat memberi daya antimikroba lebih kuat.

Dengan tidak adanya pertumbuhan koloni pada hari ke-7 sampai hari ke-28 setelah inokulasi mikroba, menunjukkan bahwa kadar antimikroba dalam ekstrak *Tamarindus indica L* dengan kandungan asam tartrat 7%, mampu memberi penjagaan terhadap pertumbuhan mikroba selama pemakaian dan penyimpanan.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Berdasarkan data yang diperoleh, disimpulkan bahwa:

1. Sediaan pencerah *vanishing cream Tamarindus indica L* dengan konsentrasi asam tartrat sebesar 5%, 6% dan 7% mempunyai efektivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*.
2. Sediaan pencerah *vanishing cream Tamarindus indica L* dengan konsentrasi asam tartrat sebesar 7% mempunyai efektivitas antimikroba terhadap *Candida albicans*.

SARAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat disarankan dilakukan penelitian lebih lanjut tentang Uji efektivitas antimikroba sediaan pencerah *vanishing cream Tamarindus indica L* yang mengandung asam tartrat 6%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1993, **Standard of ASEAN Herbal Medicine**, Vol I, Asean Countries, Jakarta, Indonesia.
- Aiache, J.M., Devissaguet, Jph., Guyot. Herman, 1993, **Farmasetika 2 Biofarmasi**, Edisi 2 (Terjemahan), Surabaya: Airlangga University Press, hal 213-19, 443-72.
- Ali MS, Ahmad VU, Azhar I and Usmaghani K. 1998, **Chemotropism and Antimicrobial Activity of Tamarindus Indica**, *Fitoterapia* : 69(1):43-46
- Aulton Michael E. 1998, **Pharmaceutics the Science of Dosage Form Design**, International Student Edition, Churchill Livingstone, New York.
- Black Jacquelyn G. 1999, **Microbiology: Principles and Exploration**, 4th edition, Prentice Hall International, Inc, New Jersey.
- DepKes RI, 1985, **Formularium Indonesia**, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- DepKes RI. 1993, **Kodeks Kosmetika Indonesia**, Edisi II, Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Depkes. 1995, **Farmakope Indonesia**, edisi 4, Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Harry RG. 1952, **Harry's Cosmeticology: The Principle and Practice of Modern Cosmetic**, 6th , Leonard Hill Book, London.
- Imbabi, E.S, Ibrahim, K.E, Ahmed, B.M, Abulfutun, I.M and Hulbert, P. 1992, **Chemical Characterization of Tamarind Bitter Principle, Tamarindineal**, *Fitoterapia*: 63(6). 537-538.
- Lachman, L. ,Lieberman, H.A, Kenig, J.L,. 1970, **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**, Philadelphia and Febiger.
- Menick, Adelberg and Jawetz. 1991, **Medical Microbiology**, 19th edition, Prentice Hall International Inc.
- Materia Medika Indonesia**, Jilid VI. 1995, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Modden, J.M. 1987, **Microbiological Methods for Cosmetics, Food and Drug Administration of Food Division of Microbiology Bacteriological Analytical Manual**, 5th edition.
- Parish Lawrence Charles, M.D, Crissey John Thorne, M.D. 1988, **Cosmetics: Historical Review, Clinic in Dermatology**, Philadelphia.
- Sagarin E, 1957, **Cosmetic Siences and Technology**, 1st Edition, Inter Science Publisher Inc., New York
- Smith, D.T, et al. 1948, **Zinnsser's Text Book of Bacteriology.** , Edisi 9, New York, Apleton Century Crofts, Inc.
- Sepp, D.T Dr. 1998, [www. Shikai.com](http://www.Shikai.com).
- Soeratri W., 2000, **Kosmetika Pemutih Kulit (Pengembangan dan Pemakaian) Seminar Sehari Pemanfaatan Prodik pemutih Kulit untuk Meningkatkan Penampilan dan Percaya Diri: LEM-FFUA**, hal 2-8
- Taylor, M.B. 2001, www.SkinCareRx.com.
- Zulkarnaen, I., 2000, Kosmetika Pemutih Kulit dan Permasalahannya: **Majalah Berkala Kedokteran Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin** Vol 15 No. 1 April 2003, hal 47-53

Lampiran - 2
HASIL ANALISIS STATISTIK ANOVA FACTORIAL
pH SEDIAAN

Oneway**ANOVA**

PH					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.733E-04	4	1.933E-04	.527	.719
Within Groups	3.667E-03	10	3.667E-04		
Total	4.440E-03	14			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: PH
 LSD

(I) HARI	(J) HARI	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	7	.0000	1.563E-02	1.000	-3.4836E-02	3.484E-02
	14	1.333E-02	1.563E-02	.414	-2.1503E-02	4.817E-02
	21	1.333E-02	1.563E-02	.414	-2.1503E-02	4.817E-02
	28	1.667E-02	1.563E-02	.311	-1.8170E-02	5.150E-02
7	1	.0000	1.563E-02	1.000	-3.4836E-02	3.484E-02
	14	1.333E-02	1.563E-02	.414	-2.1503E-02	4.817E-02
	21	1.333E-02	1.563E-02	.414	-2.1503E-02	4.817E-02
	28	1.667E-02	1.563E-02	.311	-1.8170E-02	5.150E-02
14	1	-1.3333E-02	1.563E-02	.414	-4.8170E-02	2.150E-02
	7	-1.3333E-02	1.563E-02	.414	-4.8170E-02	2.150E-02
	21	-4.4409E-16	1.563E-02	1.000	-3.4836E-02	3.484E-02
	28	3.333E-03	1.563E-02	.835	-3.1503E-02	3.817E-02
21	1	-1.3333E-02	1.563E-02	.414	-4.8170E-02	2.150E-02
	7	-1.3333E-02	1.563E-02	.414	-4.8170E-02	2.150E-02
	14	4.441E-16	1.563E-02	1.000	-3.4836E-02	3.484E-02
	28	3.333E-03	1.563E-02	.835	-3.1503E-02	3.817E-02
28	1	-1.6667E-02	1.563E-02	.311	-5.1503E-02	1.817E-02
	7	-1.6667E-02	1.563E-02	.311	-5.1503E-02	1.817E-02
	14	-3.3333E-03	1.563E-02	.835	-3.8170E-02	3.150E-02
	21	-3.3333E-03	1.563E-02	.835	-3.8170E-02	3.150E-02

* The mean difference is significant at the .05 level

Lampiran - 3

**HASIL ANALISIS STATISTIK ANOVA FACTORIAL PERTUMBUHAN
BAKTERI DAN JAMUR PADA EKSTRAKS *Tamarindus indica* L DENGAN
KANDUNGAN AHA 7% DALAM BASIS *Vanishing Cream***

Oneway

ANOVA

KOLVAR00004

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7348266666.667	4	1837066666.667	126.986	.000
Within Groups	144666666.667	10	14466666.667		
Total	7492933333.333	14			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: KOLVAR00004

LSD

(I) HARI	(J) HARI	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	7.00	55333.3333	3105.5506	.000	48413.7354	62252.9313
	14.00	55333.3333	3105.5506	.000	48413.7354	62252.9313
	21.00	55333.3333	3105.5506	.000	48413.7354	62252.9313
	28.00	55333.3333	3105.5506	.000	48413.7354	62252.9313
7.00	1.00	-55333.3333	3105.5506	.000	-62252.9313	-48413.7354
	14.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
	21.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
	28.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
14.00	1.00	-55333.3333	3105.5506	.000	-62252.9313	-48413.7354
	7.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
	21.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
	28.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
21.00	1.00	-55333.3333	3105.5506	.000	-62252.9313	-48413.7354
	7.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
	14.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
	28.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
28.00	1.00	-55333.3333	3105.5506	.000	-62252.9313	-48413.7354
	7.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
	14.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979
	21.00	.0000	3105.5506	1.000	-6919.5979	6919.5979

* The mean difference is significant at the .05 level.



LAB. BAKTERIOLOGI DAN MIKOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Jl. Mulyorejo (Kompleks Kampus C Unair), Surabaya.
Telp. (031) 5993016; Faks. (031) 5035676

SURAT KETERANGAN

Kami menerangkan bahwa mikroba yang digunakan dalam penelitian
1. Dr Siswandono, MS.

adalah

1. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
2. *Escherchia coli* (ATCC 25923)
3. *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
4. *Pseudomonas aerogenosa* (ATCC 9027)

Demikian surat keterangan kami., dapat digunakan untuk selanjutnya.

Surabaya, 05 Nopember 2003
Lab. Bakteriologi dan Mikologi
FKH-UNAIR



drh. Didik Handijatno, MS.
Nip. 130 933 208