

Formulasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Serum Antijerawat yang Mengandung Minyak Atsiri Bunga Lawang (*Illicium verum* Hook. f.)

Jessica¹, Eva Monica², dan Nur Aziz¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung, Malang, 65151, Indonesia

²Program Studi Pendidikan Profesi Apoteker, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung, Malang, 65151, Indonesia

Korespondensi: Eva Monica

Email: eva.monica@machung.ac.id

Submitted: 16-08-2024, Revised: 16-12-2024, Accepted: 21-04-2025, Published regularly: June 2025

ABSTRAK: *Acne vulgaris* merupakan peradangan unit polisebasea yang sering dikaitkan dengan infeksi *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*). Penggunaan antibiotik topikal seperti klindamisin secara berlebihan telah menyebabkan resistensi *C. acnes*, sehingga diperlukan alternatif pengobatan. Minyak atsiri bunga lawang (*Illicium verum* Hook. f.) mengandung trans-anetol yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri, namun belum banyak diteliti terhadap *C. acnes*. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga lawang terhadap *C. acnes*, menentukan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), serta mengembangkan formula serum topikal yang optimal dan efektivitas antibakteri serum minyak atsiri bunga lawang. Metode yang digunakan meliputi uji difusi agar dan makrodilusi. Kontrol positif berupa gel 1% klindamisin, sedangkan kontrol negatif menggunakan DMSO 100% dan formula tanpa minyak atsiri. Minyak atsiri konsentrasi 100% menunjukkan zona hambat terbesar $12,875 \pm 0,609$ mm. MIC tercatat sebesar 1,56%, sedangkan MBC >25%. Formula serum terbaik adalah F2 yang mengandung 5% minyak atsiri, dengan hasil evaluasi mutu organoleptis berupa cairan agak kental berwarna putih dengan aroma khas bunga lawang, homogen, pH 4,947, tipe emulsi m/a, namun belum memenuhi syarat untuk viskositas dan daya sebar. F2 mempunyai zona hambat senilai $7,558 \pm 0,319$ mm. Hasil ini menunjukkan potensi minyak atsiri sebagai antibakteri alternatif dalam pengobatan jerawat.

Kata kunci: *Acne vulgaris*; bunga lawang; *C. acnes*; klindamisin; serum antijerawat

ABSTRACT: *Acne vulgaris* is an inflammatory condition of the pilosebaceous unit frequently associated with *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) infection. Excessive use of topical antibiotics such as clindamycin has led to the emergence of resistant *C. acnes* strains, necessitating alternative therapeutic approaches. *Illicium verum* essential oil, known for its high trans-anethole content, possesses antibacterial properties, though its efficacy against *C. acnes* remains underexplored. This study aims to evaluate the antibacterial activity of *I. verum* essential oil against *C. acnes*, determine its Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and develop an optimized topical serum formulation. Antibacterial activity was assessed using agar diffusion and macro-dilution methods. A 1% clindamycin gel served as the positive control, while 100% DMSO and a base formulation without essential oil were used as negative controls. The 100% essential oil exhibited the largest inhibition zone (12.875 ± 0.609 mm), with an MIC of 1.56% and MBC >25%. The optimal serum formulation (F2) contained 5% essential oil and showed desirable organoleptic properties, pH 4.947, oil-in-water emulsion type, though it did not meet the criteria for viscosity and spreadability. Its antibacterial zone was 7.558 ± 0.319 mm. These findings indicate the potential of *I. verum* essential oil as an alternative antibacterial agent for acne treatment.

Keywords: *Acne vulgaris*; star anise; *C. acnes*; clindamycin; anti-acne serum



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

1. Pendahuluan

Acne vulgaris atau jerawat merupakan peradangan pada unit polisebasea yang umumnya keluar pada berbagai lokasi seperti wajah, lengan atas, badan, dan punggung. *Acne* atau jerawat ini merupakan penyakit kulit yang umum dan biasanya dapat sembuh dengan sendirinya (*self-limiting disease*) [1]. Berdasarkan studi *Global Burden of Disease* (GBD), prevalensi *Acne vulgaris* adalah sebesar 85% pada rentang usia 12-25 tahun [2]. Di Indonesia, diperkirakan 80% remaja mengidap *Acne Vulgaris* [3]. Salah satu bakteri penyebab jerawat adalah bakteri anaerobic *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*).

Klindamisin merupakan salah satu antibiotik oral maupun topikal yang digunakan sebagai terapi *Acne vulgaris*. Meluasnya penggunaan klindamisin sebagai agen topikal untuk pengobatan *Acne vulgaris* perlahan-lahan menyebabkan perkembangan strain *C. acnes* yang resisten terhadap klindamisin. Peningkatan resistensi ini telah dicatat di seluruh dunia, tetapi analisis terbaru di Jepang mencatat peningkatan dari 20,3% pada tahun 2009 hingga 2010 menjadi 44,1% pada tahun 2016 hingga 2017 [4]. Oleh karena itu, salah satu alternatif adalah dengan mengaplikasikan antibakteri dari sumber alami yang dapat menyembuhkan jerawat [5].

Bunga lawang (*Illicium verum* Hook. f.) merupakan bahan yang digunakan sebagai rempah dan bahan pengobatan tradisional di China [6]. Di Indonesia sendiri, bunga lawang digunakan pada makanan daerah berbumbu tajam seperti rendang Minang, gulai Aceh, masakan Jawa, dan Bali [7]. Berdasarkan penelitian, minyak atsiri bunga lawang mempunyai potensi sebagai antibakteri [8]. Senyawa utama dalam minyak atsiri bunga lawang yang memiliki aktivitas antibakteri adalah *trans*-anethole [9]. Banyak penelitian sudah dilakukan terhadap berbagai bakteri kecuali terhadap bakteri penyebab jerawat yaitu *C. acnes*. Senyawa *trans*-anethole, jika digunakan dalam konsentrasi tinggi, dapat menimbulkan iritasi kulit, dermatitis kontak, atau reaksi alergi pada

individu yang sensitif. Oleh karena itu, *European Union* melalui *IFRA* (*International Fragrance Association*) dan *SCCS* (*Scientific Committee on Consumer Safety*) merekomendasikan batas konsentrasi maksimum minyak atsiri *Illicium verum* sebesar 10% untuk penggunaan topikal, guna menghindari efek toksik lokal dan sistemik.

Serum wajah merupakan sediaan topikal berbentuk cairan ringan yang mengandung konsentrasi tinggi bahan aktif dan diformulasikan untuk penetrasi cepat ke lapisan epidermis kulit. Berbeda dengan krim atau losion, serum memiliki viskositas lebih rendah dan umumnya tidak mengandung bahan oklusif, sehingga lebih sesuai untuk jenis kulit berminyak atau berjerawat [5]. Pemilihan bentuk sediaan serum dalam penelitian ini didasarkan pada kemampuannya menghantarkan bahan aktif secara efisien tanpa menyumbat pori-pori, serta memberikan kenyamanan pada pemakaian topikal [4]. Dalam praktiknya, berbagai produk antijerawat yang beredar di pasaran telah banyak menggunakan bentuk serum karena dinilai mampu memberikan efek lokal yang lebih cepat dan merata. Minyak atsiri bunga lawang, yang mengandung senyawa *trans*-anethole dengan potensi antibakteri terhadap *Cutibacterium acnes*, secara kimiawi memiliki karakteristik volatil dan lipofilik yang memungkinkan kompatibilitasnya dalam sistem serum, baik berbasis gel maupun emulsi ringan [6]. Oleh karena itu, minyak atsiri bunga lawang berpotensi dikembangkan sebagai bahan aktif dalam sediaan serum antijerawat, dengan catatan perlu dilakukan evaluasi lebih lanjut terhadap kestabilan fisik dan keamanan penggunaan pada kulit.

Penelitian ini dilakukan untuk menghasilkan sediaan perawatan kulit yaitu serum antijerawat berbahan dasar minyak atsiri bunga lawang. Serum yang dihasilkan akan di uji efektivitas antibakterinya menggunakan metode sumuran terhadap *C. acnes*. Penelitian ini berkontribusi pada penemuan bahan alam baru dalam bentuk sediaan serum yang bermanfaat untuk pengobatan *Acne vulgaris*.

2. Bahan dan metode

2.1. Alat

Tabung reaksi (Pyrex®), rak tabung reaksi, cawan petri (Anumbra®), gelas beaker (Schott Duran®), batang pengaduk, gelas ukur (Iwaki®), labu ukur (Iwaki®), mikropipet 100 µl-1000 µl (Dragon Lab®), blue tip (Onemed®), yellow tip (Onemed®) pipet tetes, pinset, kawat ose, jangka sorong, vortex (Ika®), autoclave (Hirayama® HVE-50), laminar air flow (LAF) (Esco®), bunsen, neraca analitik (OHAUS®), inkubator (Mettler®), magnetic stirrer (LabTECH®), pHmeter (OHAUS®), viskometer stormer, kaca preparat, cover kaca preparat, erlenmeyer (Schott Duran®), spektrofotometer uv-vis V-760 (Jasco®), tabung eppendorf.

2.2. Bahan

Cutibacterium acnes (Thermo Scientific®), minyak atsiri bunga lawang (PT. Syailendra Bumi Investama), xanthan gum (Bratachem), triethanolamin (Bratachem), natrium benzoat (Bratachem), gliserin (Bratachem), akuades, methylene blue (Merck®), NaCl (Merck®), H₂SO₄, BaCl₂·2H₂O (Merck®), blood agar (Oxoid®), Mueller Hinton Broth (MHB) (Oxoid®), Gel Mediklin 1% (Dexa Medica), DMSO 100% (Merck®).

2.3. Metode

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian eksperimental. Yang termasuk dalam variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah bahan tambahan serum, proses aseptik, dan konsentrasi suspensi bakteri. Variabel bebas yang digunakan adalah konsentrasi minyak atsiri. Sementara variabel terikat adalah seluruh hasil evaluasi sediaan beserta diameter zona hambat serum terhadap bakteri, kekeruhan pada media cair untuk menentukan MIC, dan koloni bakteri pada media padat untuk menentukan MBC.

2.3.1. Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga lawang metode difusi sumuran

Dibuat 6 lubang menggunakan bagian atas blue tip steril pada blood agar yang sudah diinokulasikan *C. acnes*. Sebelum proses inokulasi, suspensi *Cutibacterium acnes* terlebih dahulu distandarkan menggunakan metode kekeruhan McFarland untuk memastikan konsistensi jumlah sel bakteri. Konsentrasi yang digunakan setara dengan standar 0,5 McFarland, yang berkisar pada $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. 40 µL minyak atsiri dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, kontrol positif (klindamisin 2 µg/40µL) dan kontrol negatif (DMSO 100%) dipipet ke dalam sumuran yang sudah dibuat. Kemudian cawan petri diinkubasi dalam kondisi anaerob selama 24 jam pada suhu 37°C menggunakan metode candle jar. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter. Zona hambat dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut [10].

$$\text{Zona hambat (mm)} = \frac{(a - c) + (b - c)}{2}$$

a = Diameter vertikal; b = Diameter horizontal; c = Diameter lubang sumuran

Hasil zona hambat kontrol positif diinterpretasikan menurut *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) pada Tabel 1 untuk mengetahui apakah terdapat resistensi pada bakteri yang digunakan. Setelah itu, diameter zona hambat minyak atsiri dibandingkan dengan kategori daya hambat menurut Davis-Stout, jika > 20 mm kategorinya sangat kuat, 11-20 mm kuat, 5-10 mm sedang, dan < 5 mm kurang [11]. Uji ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

2.3.2. Penetapan nilai MIC dan MBC minyak atsiri bunga lawang

Seri konsentrasi minyak atsiri yang digunakan adalah 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%,

Tabel 1. Interpretasi diameter zona hambat *Clindamycin* terhadap *C. acnes* [12]

Antibakteri	µg	Diameter zona hambat (mm)		
		S	I	R
Clindamycin	2	≥21	15-20	≤14

0,78%, 0,39%, dan 0,195% v/v. Kontrol positif yang digunakan adalah suspensi bakteri setara 10^6 CFU/mL dan kontrol negatif yang digunakan merupakan media MHB. Nilai MIC dapat ditentukan berdasarkan konsentrasi terkecil minyak atsiri dalam menghambat pertumbuhan bakteri (dilihat dari kekeruhan larutan yang mendekati kontrol negatif) setelah diinkubasi dalam kondisi anaerob selama 24 jam pada suhu 37°C menggunakan metode *candle jar*.

Penentuan *minimum bactericidal concentration* (MBC) dilakukan dengan menginokulasikan hasil dilusi cair yang terlihat jernih ke media *blood agar* [13]. Setelah itu, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam kondisi anaerob. MBC ditentukan berdasarkan konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan pertumbuhan organisme apapun setelah diinkubasi [14].

2.3.3. Pembuatan serum

Semua bahan ditimbang sesuai dengan Tabel 2. Xanthan gum yang sudah ditimbang ditaburkan di atas akuades sebanyak 20 kalinya, kemudian diaduk sampai homogen [15]. Selanjutnya propilen glikol dan TEA dimasukkan sedikit demi sedikit sambil terus diaduk. Natrium benzoat dan asam sitrat yang sudah dilarutkan dengan akuades juga dimasukkan sambil terus diaduk. Minyak atsiri bunga lawang dimasukkan sesuai konsentrasi yang digunakan, lalu sisa air dimasukkan dan diaduk hingga homogen.

2.3.4. Evaluasi serum

2.3.4.1. Uji organoleptis

Pengujian dilakukan untuk melihat sediaan secara visual. Parameter yang diamati adalah warna, bau, serta tekstur sediaan serum. Kemudian hasil yang didapatkan dicatat dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Tekstur yang diharapkan adalah halus dengan bau khas bunga lawang serta berwarna kuning.

2.3.4.2. Uji homogenitas

Uji dilakukan dengan meletakkan serum pada satu kaca objek secara merata, kemudian dihimpit menggunakan kaca objek lainnya. Hasil uji homogenitas yang baik pada sediaan yang dibuat adalah tidak terdapat butiran kasar atau bahan yang belum homogen [17].

2.3.4.3. Uji pH

Uji ini dilakukan untuk memastikan pH sediaan sudah sesuai dengan pH kulit sehingga tidak mengiritasi. Pengujian dilakukan dengan mencelupkan elektroda pH meter yang sudah terkalibrasi ke dalam sediaan lalu pH dicatat dan direplikasi 3 kali. pH serum yang baik adalah pada rentang 4,5 – 6,5 yang setara dengan pH kulit [18].

2.3.4.4. Uji viskositas dan sifat alir

Uji ini dilakukan dengan menggunakan viskometer stormer. Beban yang digunakan adalah 100-200 gram pada penggantung sampai dipe-

Tabel 2. Formulasi sediaan serum [16]

Bahan	Fungsi	Konsentrasi (%)			
		F0	F1	F2	F3
Minyak atsiri bunga lawang	Bahan aktif	-	2,5	5	10
Xanthan gum	<i>Gelling agent</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
TEA	Pengatur pH	3	3	3	3
Asam sitrat	Pengatur pH	2	2	2	2
Propilen glikol	Humektan	10	10	10	10
Natrium benzoat	Pengawet	0,5	0,5	0,5	0,5
Akuades	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

roleh 11 titik. Waktu yang dibutuhkan setiap 25x putaran di catat dan diulang sebanyak tiga kali replikasi. Viskositas dapat dihitung menggunakan rumus di bawah. Untuk menentukan sifat alir, diplotkan data beban (x) vs rpm (y) [19].

$$\text{Kecepatan putar (rpm)} = \frac{25 \text{ putaran}}{t \text{ (menit)}}$$

$$\text{Viskositas (cP)} = kv \times \frac{\text{bobot (gr)}}{v \text{ (rpm)}}$$

2.3.4.5. Uji daya sebar

Sediaan sebanyak 3 tetes diletakkan di atas alat uji daya sebar, kemudian dihimpit menggunakan tutupnya selama 1 menit. Beban seberat 1, 3, 5 dan 7 gram selanjutnya ditambahkan dan didiamkan selama 1 menit pada tiap beban yang ditambahkan. Diameter sediaan diukur menggunakan penggaris pada 3 sisi, lalu dihitung luas permukaannya. Uji dilakukan dengan 3 kali replikasi. Syarat daya sebar sediaan yang baik adalah 5-7 cm [17].

2.3.4.6. Uji distribusi ukuran globul

Sedikit sediaan serum diletakkan di atas kaca preparat, kemudian ditutup menggunakan kaca penutup. Kaca preparat selanjutnya diletakkan di bawah lensa mikroskop dan difoto menggunakan aplikasi *OptiLab Viewer*. Diameter rata-rata, nilai SD, serta RSD dihitung dan dianalisis dari 3 kali replikasi pengujian. Sediaan serum dinyatakan monodispers jika antilog SD < 1,2 dan polidispers jika antilog SD > 1,2 [20].

2.3.4.7. Uji tipe emulsi

Pengujian ini dilakukan untuk memastikan bahwa tipe serum yaitu minyak dalam air (M/A). Sediaan diambil sedikit dan ditempatkan dalam gelas beaker, kemudian diteteskan sedikit *methylen blue* lalu dihomogenkan. Campuran tersebut selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Sediaan M/A akan menghasilkan warna biru pada latar.

2.3.4.8. Uji hedonik

Uji ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kesukaan responden terhadap serum yang dibuat

tanpa mengaplikasikan ke kulit. Dalam penelitian ini, sebanyak 35 responden diberikan *link google form* yang berisi tingkat kesukaan terhadap sediaan berdasarkan warna, tekstur, dan aroma. Skala yang digunakan yaitu 1 (Sangat tidak suka), 2 (Tidak suka), 3 (Netral), 4 (Suka), 5 (Sangat suka).

2.3.4.9. Uji efektivitas antibakteri serum dengan metode difusi sumuran

Sebanyak 40 µL F1, F2, F3, kontrol positif dan kontrol negatif (F0) dipipet ke dalam sumuran yang sudah dibuat pada *blood agar* yang sudah diinokulasikan. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam kondisi anaerob menggunakan metode *candle jar*. Zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dan dihitung seperti pada uji aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga lawang.

2.4. Analisis data

Data hasil uji organoleptis, homogenitas, hedonik, distribusi ukuran globul, tipe emulsi, MIC, dan MBC dianalisis secara deskriptif. Sedangkan data pH, viskositas, daya sebar, aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga lawang serta efektivitas antibakteri serum menggunakan difusi sumuran (*agar well diffusion method*) dianalisis dengan software SPSS 25 menggunakan uji ANOVA.

3. Hasil dan pembahasan

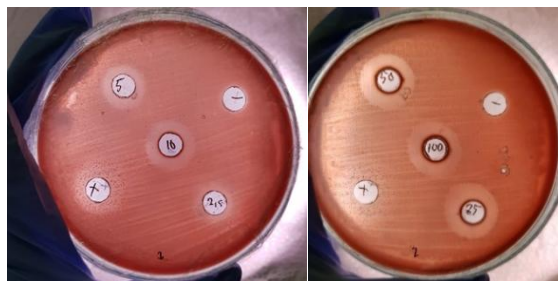
3.1. Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga lawang metode sumuran

Berdasarkan interpretasi CLSI, bakteri *C. acnes* yang digunakan masuk ke dalam kategori intermediat terhadap klindamisin. Pada konsentrasi minyak atsiri 2,5-10%, daya hambat yang dihasilkan masuk ke dalam kategori sedang berdasarkan Davis-Stout [11]. Kemudian pada konsentrasi 25-100%, zona hambat yang dihasilkan memiliki aktivitas antibakteri yang kuat seperti terlihat pada Tabel 3.

Trans-anethole, senyawa utama dalam minyak atsiri bunga lawang, termasuk dalam kelompok

Tabel 3. Hasil uji difusi sumuran minyak atsiri terhadap bakteri *C. acnes*

Konsentrasi (%v/v)	Zona hambat (mm $\pm$ SD)
100	12,875 $\pm$ 0,609
50	12,025 $\pm$ 0,664
25	11,500 $\pm$ 1,119
10	9,433 $\pm$ 0,295
5	7,333 $\pm$ 0,246
2,5	5,433 $\pm$ 0,450
Kontrol positif ^a	16,408 $\pm$ 2,461
Kontrol negatif ^b	ND

ND = *Not detected* (tidak terdeteksi)Semua nilai mewakili rata-rata zona hambat (mm) $\pm$ standar deviasi (n = 3)^a Klindamisin 2 μ g^b DMSO 100%**Gambar 1.** Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga lawang

fenilpropanoid yang merupakan bagian dari senyawa fenol hasil jalur biosintesis sikimat. Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antibakteri melalui beberapa mekanisme kerja yang saling berkaitan. Secara umum, mekanisme antibakteri senyawa fenol terhadap bakteri gram-positif melibatkan gangguan terhadap struktur peptidoglikan pada dinding sel. Fenol menghambat penggabungan asam N-asetilmuramat ke dalam struktur mukopeptida, suatu proses penting dalam pembentukan dinding sel yang kaku. Gangguan terhadap sintesis dinding sel ini menyebabkan terbentuknya struktur sel yang tidak sempurna, sehingga dinding sel kehilangan kekakuannya dan menyisakan membran sel yang lebih mudah rusak dan bocor [21]. Selain itu, trans-anethole juga diduga dapat mengganggu integritas membran sel bakteri secara langsung, yang pada akhirnya memengaruhi proses respirasi dan pengangkutan ion besi yang esensial bagi kelang-

sungan metabolisme bakteri [22]. Senyawa fenol seperti trans-anethole juga dapat menyebabkan denaturasi protein seluler, yang akan menghentikan aktivitas metabolisme dan mengakibatkan kematian sel bakteri [23].

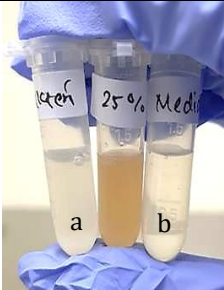
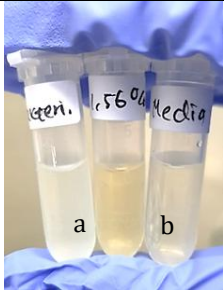
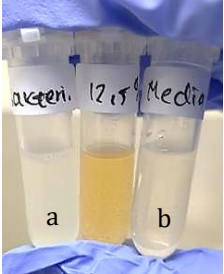
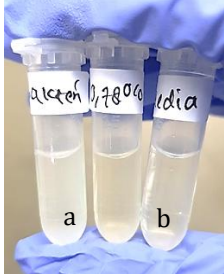
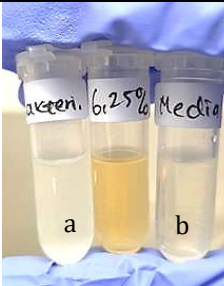
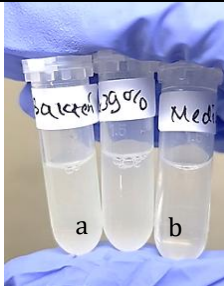
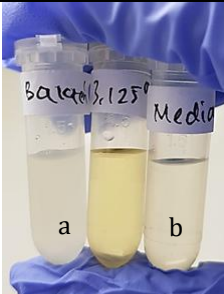
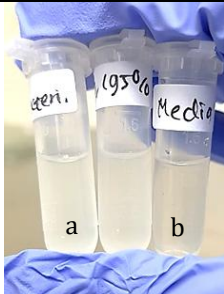
Mekanisme resistensi bakteri *C. acnes* berkaitan dengan mekanisme kerja antibakteri. Klindamisin sendiri merupakan antibakteri bakteristatik yang menghambat sintesis protein bakteri yaitu dengan mengikat subunit RNA ribosom (rRNA) 23S. Terjadinya mutasi di situs pengikatan 23S rRNA menyebabkan terjadinya resistensi terhadap klindamisin [24].

Data zona hambat kemudian dianalisis menggunakan program SPSS. Berdasarkan uji *Shapiro-Wilk* data berdistribusi normal (sig > 0,05). Pada pengujian homogenitas, data dinyatakan tidak homogen (nilai sig rata-rata < 0,05). Setelah itu, data dianalisis menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *post hoc* yaitu *tamhane*.

Di lihat dari hasil uji *Tamhane*, zona hambat yang berbeda signifikan adalah pada konsentrasi 100% dan 2,5%, 50% dan 2,5%, 10% dan 5%, serta 10% dan 2,5%. Hal tersebut dapat terjadi karena variasi konsentrasi minyak atsiri bunga lawang yang digunakan mempengaruhi besarnya zona hambat yang terbentuk. Dimana semakin besar konsentrasi minyak atsiri bunga lawang yang digunakan, semakin besar zona hambat yang dihasilkan. Berdasarkan hasil yang didapatkan, konsentrasi yang digunakan dalam formula adalah 10, 5, dan 2,5%,

dikarenakan pada konsentrasi tersebut, zona hambat yang dihasilkan tidak berbeda secara signifikan dengan konsentrasi 100, 50, dan 25%. Selain itu, batas maksimum persentase penggunaan minyak atsiri bunga lawang yang dianjurkan European Union (EU) adalah sebesar 10% [25]. Hal ini terutama berkaitan dengan aspek keamanan toksikologi dan iritasi kulit, serta berdasarkan evaluasi terhadap senyawa aktif dominan dalam minyak atsiri tersebut, yaitu trans-anetol.

Tabel 4. Hasil uji MIC dari berbagai konsentrasi minyak atsiri dibandingkan dengan larutan a (media MHB + suspensi bakteri) (keruh) dan larutan b (media MHB) (jernih)

Keterangan	Hasil pengamatan	Keterangan	Hasil pengamatan
Konsentrasi minyak atsiri 25% (v/v) Hasil: jernih		Konsentrasi minyak atsiri 1,56% (v/v) Hasil: jernih	
Konsentrasi minyak atsiri 12,5% (v/v) Hasil: jernih		Konsentrasi minyak atsiri 0,78% (v/v) Hasil: keruh	
Konsentrasi minyak atsiri 6,25% (v/v) Hasil: jernih		Konsentrasi minyak atsiri 0,39% (v/v) Hasil: keruh	
Konsentrasi minyak atsiri 3,125% (v/v) Hasil: jernih		Konsentrasi minyak atsiri 0,195% (v/v) Hasil: keruh	

3.2. Penentuan nilai MIC dan MBC minyak atsiri bunga lawang

Pada konsentrasi 0,195%, 0,39%, dan 0,78% setelah dilakukan inkubasi selama 48 jam, sampel masih terlihat keruh jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Sedangkan mulai dari konsentrasi 1,56%, larutan terlihat jernih. Sehingga MIC dari minyak atsiri bunga lawang adalah 1,56% (Tabel 4).

Setelah itu, nilai *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) ditentukan berdasarkan hasil MIC yaitu mulai konsentrasi 1,56% sampai 25%. Pada konsentrasi 1,56%, 3,125%, 6,25%, dan 12,5% masih terdapat koloni bakteri yang tumbuh. Sedangkan pada konsentrasi 25%, bakteri yang tumbuh terlihat lebih sedikit dibandingkan konsentrasi lainnya. Oleh karena itu, nilai MBC dari minyak atsiri bunga lawang adalah >25%. Pada semua hasil replikasi MBC terlihat adanya tolotan berwarna merah gelap pada media *blood agar* yang digunakan, hal ini dimungkinkan terjadi karena pada media darah terjadi kerusakan eritrosit saat pembuatan, bisa terbentuk endapan atau tolotan kecil dari hemoglobin yang terdegradasi (Gambar 2).

3.3. Evaluasi serum

3.3.1. Uji organoleptik

Berdasarkan hasil, konsistensi dari semua formula tidak terdapat perbedaan yaitu cair agak

kental. Warna putih dihasilkan pada serum F1 dan F2. Sedangkan pada F3, warna yang dihasilkan adalah putih kekuningan. Hal tersebut terjadi karena adanya penambahan minyak atsiri bunga lawang dengan konsentrasi yang semakin besar. Pada F1, F2, dan F3 semuanya beraroma khas bunga lawang, di mana semakin besar konsentrasi minyak atsiri bunga lawang yang digunakan, aroma yang dihasilkan juga semakin kuat (Tabel 5).

3.3.2. Uji homogenitas

Homogenitas sediaan sangat penting dalam suatu sediaan, agar menjamin bahan obat/aktif terdispersi secara merata, sehingga pada setiap bagian akan mengandung jumlah obat/bahan aktif yang sama [18]. Berdasarkan hasil pengamatan, semua formula yang dibuat sudah memenuhi persyaratan homogenitas, karena tidak terdapat butiran kasar dan sudah tercampur dengan baik.

3.3.3. Uji pH

Nilai pH sediaan serum wajah yang baik idealnya berada dalam rentang pH fisiologis kulit, yaitu antara 4,5 hingga 6,5. Rentang ini penting untuk menjaga fungsi sawar kulit dan mencegah gangguan seperti iritasi (jika pH terlalu rendah) atau kulit kering dan bersisik (jika pH terlalu tinggi). Dalam formulasi ini, diketahui bahwa minyak atsiri bunga lawang memiliki pH alami



Gambar 2. Hasil MBC

Tabel 5. Hasil uji organoleptis

Formula	Indikator			Hasil
	Warna sediaan	Aroma sediaan	Bentuk sediaan	
F1	Putih	Khas bunga lawang	Cair agak kental	
F2	Putih	Khas bunga lawang	Cair agak kental	
F3	Putih kekuningan	Khas bunga lawang	Cair agak kental	

Tabel 6. Hasil uji pH

Formula	F1	F2	F3
Rata-rata $\pm$ SD	4,947 $\pm$ 0,005	4,977 $\pm$ 0,019	4,983 $\pm$ 0,009

sekitar 5,93, yang masih berada dalam rentang pH kulit. Namun, penambahan TEA (triethanol-amine) yang bersifat basa (pH $\sim$ 10,5) berpotensi meningkatkan pH akhir sediaan. Untuk menyeimbangkan pH sistem agar tetap dalam rentang yang aman dan nyaman bagi kulit, ditambahkan asam sitrat sebagai agen penyesuaian pH. Berdasarkan hasil pengukuran pada Tabel 6, pH akhir dari ketiga formula menunjukkan bahwa semua sediaan berada dalam rentang pH kulit yang sesuai. Hal ini mengindikasikan bahwa kombinasi bahan dan penyesuaian pH dengan asam sitrat berhasil menghasilkan serum yang stabil dan aman digunakan secara topikal [18].

Data dari uji pH yang dilakukan selanjutnya dianalisis menggunakan program SPSS 25. Data dinyatakan tidak berdistribusi normal berdasar-

kan hasil uji distribusi normal menggunakan *Shapiro-Wilk* (sig < 0,05). Maka uji yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis*, dimana didapatkan nilai sig > 0,05 senilai 0,085, yang menandakan tidak terdapat perbedaan signifikan pada nilai pH antar tiap formulasi serum. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa variasi konsentrasi minyak atsiri bunga lawang yang digunakan pada tiap formula tidak mempengaruhi nilai pH serum.

3.3.4. Uji viskositas dan sifat alir

Syarat viskositas serum wajah yang baik adalah 230-1150 cPs [17]. Berdasarkan hasil uji viskositas, rata-rata viskositas yang dihasilkan secara berurutan dari F1 ke F3 adalah 98,122, 115,265 dan 119,043 cPs. Semua formula tidak masuk ke dalam syarat viskositas serum yang

baik. Hal tersebut dapat disebabkan oleh kurang besarnya persentase xanthan gum sebagai *gelling agent* yang digunakan.

Berdasarkan hasil uji *Shapiro-Wilk*, data berdistribusi normal ($\text{sig} > 0,05$). Pada pengujian homogenitas, dihasilkan nilai sig rata-rata $> 0,05$ yaitu 0,723, sehingga data viskositas homogen. Analisis data dilanjutkan menggunakan ANOVA, dan dihasilkan nilai $\text{sig} < 0,05$, sehingga data dikatakan berbeda secara signifikan. Kemudian dilakukan uji *post hoc* menggunakan uji LSD, dimana semua formula menghasilkan $\text{sig} < 0,05$, sehingga semua hasil viskositas berbeda secara signifikan. Variasi konsentrasi minyak atsiri bunga lawang yang digunakan pada tiap formula dapat dikatakan mempengaruhi viskositas serum. Jika dilihat dari rata-rata viskositas yang dihasilkan, semakin besar konsentrasi minyak atsiri bunga lawang yang digunakan, semakin besar pula nilai viskositas dalam serum. Minyak atsiri merupakan komponen lipofilik yang mana, dalam konsentrasi tinggi, dapat meningkatkan viskositas sistem, terutama pada sediaan tipe emulsi yang mengandung fase minyak dalam jumlah besar. Peningkatan viskositas ini dapat mempengaruhi sifat alir dan kemampuan penyebaran sediaan di permukaan kulit, yang pada akhirnya berdampak

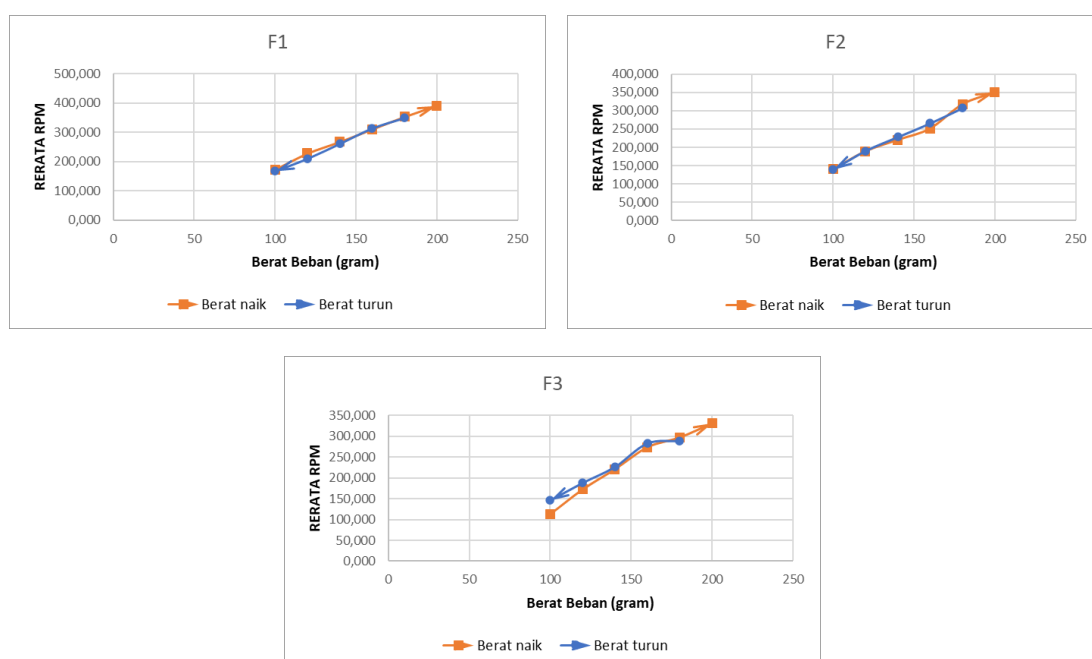
pada kenyamanan penggunaan dan efektivitas penghantaran zat aktif.

Sifat alir dari sediaan yang dibuat juga dapat ditentukan dari hasil uji viskositas. Hasil sifat alir dari tiap formula disajikan dalam Gambar 3. Sifat alir ditentukan untuk mengetahui apakah suatu sediaan dapat dengan mudah dituang dari wadahnya. Berdasarkan grafik dari tiap formula, sifat alir yang dimiliki serum adalah pseudoplastis karena tidak membentuk grafik yang linear. Selain itu, viskositas pada sediaan pseudoplastis menurun dengan meningkatnya laju geser [26].

3.3.5. Uji daya sebar

Sediaan yang memiliki daya sebar baik menyebabkan zat aktif lebih cepat terabsorpsi, karena kontak antara kulit dan sediaan menjadi lebih luas [27]. Syarat daya sebar yang baik adalah berdiameter 5-7 cm. Daya sebar dipengaruhi oleh kekentalan sediaan yang dibuat, dimana semakin encer sediaan maka akan semakin mudah menyebar dibandingkan sediaan yang lebih kental.

Berdasarkan hasil uji daya sebar, semua formula tidak sesuai dengan syarat daya sebar yang baik (Tabel 7). Ketidaksesuaian dapat disebabkan oleh kurang kentalnya sediaan serum yang dihasilkan. Hal tersebut terbukti pada hasil uji



Gambar 3. Grafik sifat alir

viskositas yang semuanya berada dibawah syarat yang ditentukan. Xanthan Gum sebagai *gelling agent* dalam penelitian ini berperan penting dalam viskositas serum yang dihasilkan.

Berdasarkan hasil uji *Shapiro-Wilk*, data yang dihasilkan berdistribusi normal ($\text{sig} > 0,05$). Pada pengujian homogenitas, dihasilkan nilai sig rata-rata $> 0,05$ pada semua beban yang ditambahkan, sehingga data daya sebar yang dihasilkan homogen. Setelah itu, analisis dilanjutkan dengan ANOVA, dimana seluruh data menghasilkan $\text{sig} > 0,05$, sehingga daya sebar antar formula dapat dikatakan tidak berbeda secara signifikan. Penambahan konsentrasi minyak atsiri bunga lawang pada serum tidak mempengaruhi daya sebar serum.

3.3.6. Uji distribusi ukuran globul

Berdasarkan hasil, semua formulasi serum termasuk ke dalam sediaan yang memiliki globul polidispers, karena antilog SD yang dihasilkan $> 1,2$. Diameter rata-rata ukuran globul yang dihasilkan berada pada rentang 8,959-14,309 μm (Tabel 8). Di mana rentang tersebut tidak sesuai dengan syarat ukuran globul emulsi yaitu 0,1 nm – 10 μm . Ukuran globul yang besar dapat disebabkan oleh proses pengadukan yang dilakukan secara manual menggunakan batang pengaduk. Untuk memperkecil ukuran globul, maka dapat digunakan alat ultra turrax dalam pembuatan sediaan.

3.3.7. Uji tipe emulsi

Serum yang dibuat pada penelitian ini ditujukan untuk kulit berjerawat yang biasanya juga memiliki jenis kulit berminyak. Oleh karena itu, sediaan serum yang dibuat diharapkan memiliki tipe emulsi minyak dalam air (M/A) yang lebih mudah dibersihkan serta tidak menimbulkan rasa lengket dan berminyak. Hasil pengujian tiap formula yang dibuat adalah emulsi dengan tipe M/A dan sudah sesuai dengan spesifikasi serum yang diinginkan (Tabel 9).

3.3.8. Uji hedonik

Dari rata-rata aroma, warna, dan tekstur formulasi, terlihat bahwa responden lebih menyukai F2. Hal tersebut karena aromanya tidak tercium atau tidak terlalu kuat dan juga warnanya lebih putih jika dibandingkan F3 (formula yang kurang disukai karena warnanya sedikit kuning). Selain itu, tekstur F2 paling disukai karena dirasa memiliki tekstur yang pas yaitu tidak terlalu lengket maupun cair. Hasil uji hedonik terlihat pada Tabel 10 dan Gambar 4.

3.3.9. Uji efektivitas antibakteri serum metode difusi sumuran

Berdasarkan hasil pada Tabel 11 dan Gambar 5, kontrol negatif menghasilkan zona hambat sebesar $4,200 \pm 0,347$ mm. Hal tersebut dapat

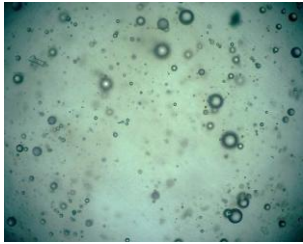
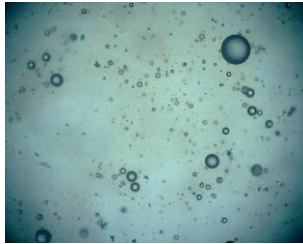
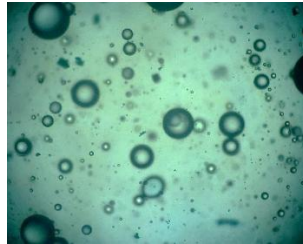
Tabel 7. Hasil uji daya sebar

Beban	Rata-rata $\pm$ SD (cm)		
	F1	F2	F3
0 g	8,272 $\pm$ 0,067	8,167 $\pm$ 0,178	8,156 $\pm$ 0,178
1 g	8,400 $\pm$ 0,027	8,333 $\pm$ 0,191	8,211 $\pm$ 0,057
3 g	8,478 $\pm$ 0,042	8,400 $\pm$ 0,125	8,278 $\pm$ 0,057
5 g	8,467 $\pm$ 0,027	8,422 $\pm$ 0,137	8,322 $\pm$ 0,068
7 g	8,533 $\pm$ 0,054	8,467 $\pm$ 0,125	8,344 $\pm$ 0,057

Tabel 8. Hasil uji distribusi ukuran globul

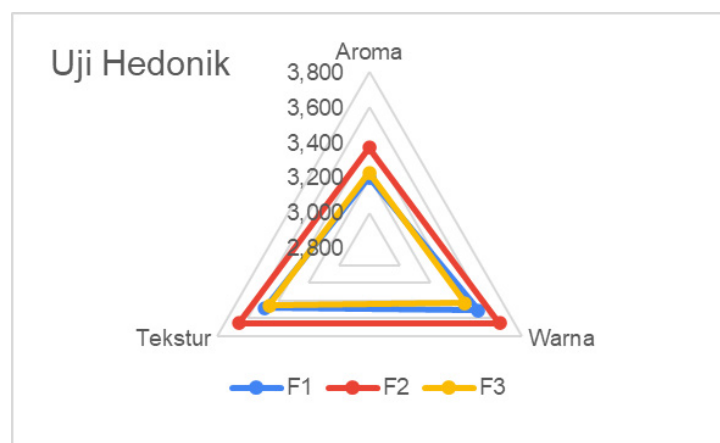
Formula	F1 (μm)	F2 (μm)	F3 (μm)
Diameter rata-rata ukuran globul $\pm$ antilog SD	8,959 $\pm$ 2,086	8,820 $\pm$ 1,601	14,309 $\pm$ 4,518

Tabel 9. Hasil uji tipe emulsi

Pengujian	F1	F2	F3
Hasil			
Tipe emulsi	M/A	M/A	M/A

Tabel 10. Hasil uji hedonik

Formulasi	Rata-rata aroma	Rata-rata warna	Rata-rata tekstur
F1	3,2	3,514	3,486
F2	3,371	3,657	3,657
F3	3,229	3,429	3,457

**Gambar 4.** Diagram radar uji hedonik

disebabkan oleh adanya penggunaan bahan pengawet natrium benzoat yang juga memiliki aktivitas antibakteri [28]. Walaupun kontrol positif berdasarkan tabel interpretasi CLSI masuk ke dalam kategori sensitif, adanya pertumbuhan koloni bakteri dalam zona hambat kontrol positif menandakan bahwa bakteri yang digunakan resisten terhadap klindamisin. Sedangkan ketiga formula berdasarkan kategori Davis-Stout, menghasilkan zona hambat yang sedang. Hasil uji menunjukkan bahwa formulasi serum bunga lawang memiliki aktivitas antibakteri terhadap

Cutibacterium acnes, yang ditunjukkan melalui terbentuknya zona hambat pada media uji. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa aktif dalam serum bunga lawang berpotensi memberikan efek antimikroba. Efektivitas ini mendukung pemanfaatan minyak atsiri bunga lawang sebagai kandidat bahan aktif dalam sediaan perawatan kulit berjerawat, meskipun diperlukan penelitian lanjutan untuk penguatan bukti aktivitas dan optimalisasi formulasi.

Berdasarkan uji *Shapiro-Wilk*, data berdistribusi normal ($\text{sig} > 0,05$). Pada pengujian ho-

Tabel 11. Hasil uji efektivitas antibakteri serum terhadap bakteri *C. acnes*

Formulasi (%v/v)	Zona hambat (mm $\pm$ SD)
F3 (10%)	8,267 $\pm$ 0,170
F2 (5%)	7,558 $\pm$ 0,319
F1 (2,5%)	7,183 $\pm$ 1,207
Kontrol positif ^a	22,067 $\pm$ 1,686
Kontrol negatif ^b	4,200 $\pm$ 0,347

Semua nilai mewakili rata-rata zona hambat (mm) $\pm$ standar deviasi (n = 3)

^a Gel Mediklin (Klindamisin 1%)

^b Serum Formula 0

**Gambar 5.** Uji efektivitas antibakteri serum terhadap bakteri *C. acnes***Tabel 12.** Hasil uji *Tamhane* efektivitas antibakteri serum

Formula	F1	F2	F3	Kontrol positif ^a	Kontrol negatif ^b
F1	-	1	0,982	0,009	0,634
F2	1	-	0,515	0,052	0,040
F3	0,982	0,515	-	0,067	0,048
Kontrol positif ^a	0,009	0,052	0,067	-	0,027
Kontrol negatif ^b	0,634	0,040	0,048	0,027	-

^a Gel Mediklin (Klindamisin 1%)

^b Serum Formula 0

mogenitas, dihasilkan nilai sig rata-rata < 0,05 sebesar 0,014, sehingga data tidak homogen. Analisis data dilanjutkan menggunakan ANOVA, kemudian uji *post hoc* yang digunakan adalah *tamhane*. Dilihat dari hasil uji *Tamhane*, zona hambat antar formula tidak ada yang berbeda signifikan karena sig > 0,05. Pada F2 didapatkan hasil bahwa uji efektifitas antibakteri serum tidak berbeda signifikan terhadap kontrol positif, dan semua formula berbeda signifikan terhadap kontrol negatif (Tabel 12).

4. Kesimpulan

Minyak atsiri bunga lawang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *C. acnes*, dengan zona hambat paling besar dihasilkan pada konsentrasi 100%. Nilai MIC dari minyak atsiri bunga lawang adalah 1,56% dan nilai MBC dinyatakan >25%. Dilihat dari hasil uji hedonik, organoleptis, homogenitas, pH dan tipe emulsi maka serum yang memenuhi syarat adalah pada F2. Selain itu, zona hambat yang dihasilkan termasuk ke dalam

kategori sedang, sebesar $7,558 \pm 0,319$ mm. Oleh karena itu, serum F2 dapat digunakan sebagai alternatif dari sediaan topikal klindamisin untuk terapi jerawat.

Ucapan terima kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Laboratorium Farmasi Universitas Ma Chung atas fasilitas dan dukungan yang telah diberikan, sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

Daftar pustaka

- Wells BG, DiPiro JT, Schwinghammer TL, DiPiro C V. Pharmacotherapy handbook, tenth. United States of America: Mc Graw-Hill Education; 2017.
- Lynn D, Umari T, Dellavalle R, Dunnick C. The epidemiology of *Acne vulgaris* in late adolescence. *Adolesc Health Med Ther*. 2016;13.
- Tamba ABP, Jusuf NK. The association between skin types and *Acne vulgaris*. *Sumatera Medical Journal*. 2020;3(1):34–40.
- Dallo M, Patel K, Hebert AA. Topical antibiotic treatment in dermatology. *Antibiotics*. 2023;12(2): 1–13.
- Fitri N, Fatimah I, Chabib L, Fajarwati FI. Formulation of antiacne serum based on lime peel essential oil and in vitro antibacterial activity test against *Propionibacterium acnes*. *AIP Conf Proc*. 2017;1823.
- Luís Â, Sousa S, Wackerlig J, Dobusch D, Duarte AP, Pereira L, et al. Star anise (*Illicium verum* Hook. f.) essential oil: Antioxidant properties and antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii*. *Flavour Fragr J*. 2019;34(4):260–70.
- Rosari AR, Duniaji AS, Nociantiri KA. Uji fitokimia ekstrak bunga lawang (*Illicium verum* Hook.f) dan daya hambatnya terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 2018;7(4):148–55.
- Damayanti R, Tamrin, Eddyanto, Alfian Z. *Illicium verum* essential oil as antibacterial agent. *SCITE-PRESS*. 2020;96–9.
- Sharafan M, Jaferník K, Ekiert H, Kubica P, Kocjan R, Blicharska E, et al. *Illicium verum* (star anise) and trans-anethole as valuable raw materials for medicinal and cosmetic applications. *Molecules*. 2022;27(3).
- Tjiptoningsih UG. Uji daya hambat air perasan buah lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *JITEKGI*. 2020;16(2):86–96.
- Davis WW, Stout TR. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. *Appl Microbiol*. 1971;22(4):659–665.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2025.
- Purwaningsih D, Wulandari D. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*. 2020;11:1–7.
- Gupta S, Nath A, Gupta MK, Sundaram S. Phytochemical analysis and antibacterial activity of different citrus fruit peels. *Int J Pharm Sci Res*. 2021;12(11):5820–6.
- Kurniawati AY, Wijayanti ED. Karakteristik sediaan serum wajah dengan variasi konsentrasi sari rimpang temu giring (*Curcuma heyneana*) terfermentasi *Lactobacillus bulgaricus*. Malang; 2018.
- Fikayuniar L, Kusumawati AH, Silpia MP, Monafita H, Tusyaadah L, Farmasi F, et al. Formulasi dan uji efektivitas antibakteri sediaan serum antijerawat ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum Xafricanum* Lour.). *Jurnal Buana Farma*. 2021;1(4):14–20.
- Liandhajani, Fitria N, Padua RA. Karakteristik dan stabilitas sediaan serum ekstrak buah kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan variasi konsentrasi. *Pharmamedica Journal*. 2022;7(1):17–27.
- Dominica D, Handayani D. Formulasi dan evaluasi sediaan lotion dari ekstrak daun lengkung (*Dimo-*

- carpus longan*) sebagai antioksidan. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2019;6(1):1–7.
19. Khaira Z, Monica E, Yoesditira CD. Formulasi dan uji mutu fisik sediaan serum mikroemulsi ekstrak biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *SAINSBERTEK Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi*. 2022;3(1).
 20. Anggreini BD. Optimasi formula suspensi siprofloksasin menggunakan kombinasi Pulvis Gummi Arabici (PGA) dan Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) dengan metode desain faktorial. 2013.
 21. Hidayah N, Mustikaningtyas D, Bintari SH. Aktivitas antibakteri infusa simplisia *Sargassum muticum* terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Life Science*. 2017;6(2):49-54.
 22. Alhajj MS, Qasem MAA, Jar ENAR, Al-Mufarrej SI. In-vitro antibacterial and antifungal effects of high levels of Chinese star anise. *Rev Bras Cienc Avic*. 2019;21(1).
 23. Marfuah I, Dewi N, Rianingsih L. Kajian Potensi ekstrak anggur laut (*Caulerpa racemosa*) sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *J. Peng. & Biotek. Hasil Pi*. 2018;7(1):7-14.
 24. George S, Muhaj FF, Nguyen CD, Tying SK. Part I antimicrobial resistance: Bacterial pathogens of dermatologic significance and implications of rising resistance. *J Am Acad Dermatol*. 2022; 86(6):1189–204.
 25. Tisserand R, Young R. Essential oil safety. 2nd ed. London: Elsevier; 2014.
 26. Sinko PJ. Martins physical pharmacy and pharmaceutical sciences. 6th ed. 2011.
 27. Lumentut N, Jaya EH, Melindah RE. Formulasi dan uji stabilitas fisik sediaan krim ekstrak etanol kulit buah pisang goroho (*Musa acuminata* L.) konsentrasi 12,5% sebagai tabir Surya. *Jurnal MIPA* 9. 2020;9(2):42–6.
 28. Oladapo AS, Akinyosoye FA, Abiodun OA. The inhibitory effect of different chemical food preservatives on the growth of selected food borne pathogenic bacteria. *Afr J Microbiol Res*. 2014;8(14):1510–5.