

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian *eksperimental*. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi karakteristik fisik dan aktivitas *antiacne lotion* ekstrak purifikasi daun cengkeh serta mengevaluasi konsentrasi efektif penghambat *Propionibacterium acnes*. Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap. Tahap pertama, yaitu tahap persiapan yang meliputi persiapan alat dan bahan, penentuan konsentrasi dan penentuan formula serta merancang prosedur. Tahap kedua, yaitu pembuatan *lotion antiacne* dan pengujian karakteristik fisik meliputi organoleptis, homogenitas, pH, daya lekat, daya sebar, viskositas, stabilitas dipercepat dan sentrifugasi serta pengujian aktivitas *lotion antiacne*. Tahap ketiga, yaitu tahap analisa data dari hasil pengujian.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- b. Penelitian ekstraksi dan purifikasi dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Penelitian uji aktivitas *lotion antiacne* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Sultan Agung.
- d. Penelitian formulasi dan karakteristik fisik *lotion* dilakukan di Laboratorium Teknologi farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

e. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Mei-Juli 2022

C. Subjek Penelitian

Daun cengkeh yang digunakan berasal dari Desa Gawah Kabupaten Lombok Timur. Daun cengkeh yang digunakan dengan kriteria daunnya berwarna hijau tua dan tidak menggunakan daun yang sudah kering dari pohonnya.

D. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional Karakteristik Fisik *Lotion*

Variabel	Sub Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Karakteristik Fisik <i>Lotion</i>	Organoleptis	Mengamati karakteristik fisik seperti warna, bau dan bentuk <i>lotion</i>	Visual	Warna, bau dan bentuk	-
	Homogenitas	Mengamati tercampur atau tidaknya semua bahan secara merata yang ditandai dengan tidak adanya partikel pada <i>lotion</i>	Visual	Homogen atau tidak homogen	-
	pH	Mengamati tingkat keasaman <i>lotion</i>	pH Meter	Nilai pH dengan rentang 4,5 – 8	Nominal
		Mengamati	Stopwatch	Daya lekat	Nominal

	Daya Lekat	waktu yang dibutuhkan <i>lotion</i> melekat pada kulit	dan Kaca objek	sediaan sebaiknya ≥ 1 detik	
	Daya Sebar	Mengamati penyebaran <i>lotion</i> saat dioleskan pada kulit	Kaca bulat	Daya sebar gel yang baik 5-7 cm	Nominal
	Viskositas	Mengamati adanya perubahan kekentalan <i>lotion</i>	Viskometer <i>brookfield</i>	2000-50000 cP	Nominal
	Stabilitas dipercepat	Cycling test adalah pengujian mempercepat terjadinya perubahan yang terjadi pada kondisi normal	Visual	Stabil atau tidak stabil	-
	Sentrifugasi	Mengamati terpisahnya fase minyak dan air pada <i>lotion</i>	Sentrifugator	Terjadinya permissahan fase atau tidak	-
Aktivitas farmakologi	Aktivitas <i>lotion Antiacne</i>	Menghitung diameter Zona hambat	Jangka sorong	Zona hambat (mm)	Nominal

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi variabel lain dalam penelitian. Variabel bebas pada penelitian ini adalah *lotion* ekstrak purifikasi daun cengkeh dengan konsentrasi 0,5 %, 1%, dan 1,5%.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel lain untuk mengukur besarnya pengaruh yang diberikan. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah karakteristik fisik dan aktivitas *lotion antiacne*

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan variabel terkendalinya agar hasil yang ditetapkan tidak tersebar. Variabel terkendali dalam penelitian penelitian ini meliputi penyimpanan, penimbangan sterilitas dan suhu pada ekstrak purifikasi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum L*)

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat adalah timbangan analitik, blender, stopwatch, ayakan nomer 100 mesh, bejana maserasi, batang pengaduk, cawan porselin, cawan petri, mikro pipet, jarum ose, kapas steril, kertas cakram, refrigerator, lampu spiritus, kaki tiga, kawat kasa, Inkubator CO₂, penjepit kayu, *Beaker glass*, *Erlenmeyer*, *Rotary evaporator*, mortir, stemper, botol kaca, kaca objek, pH meter, viskometer *brookfield* dan *Climatic chamber*

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun cengkeh, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Propionibacterium acnes*, Gliserin, TEA, asam stearat, setil alkohol, paraffin cair, nipagin, nipasol dan aquadest

G. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan bertujuan menghindari kesalahan dalam pengambilan tanaman untuk bahan penelitian dan memastikan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh.

2. Prosedur Penelitian

Daun cengkeh yang daunnya sudah berwarna hijau tua dilakukan sortasi basah dengan air mengalir untuk memisahkan kotoran dengan daun. Daun cengkeh ditutup dengan kain hitam kemudian dikeringkan secara tidak langsung dibawah sinar matahari. Daun cengkeh yang sudah kering dilakukan sortasi kering untuk memisahkan kotoran dari benda-benda yang menempel pada daun. Setelah itu, daun cengkeh dibuat serbuk dengan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan nomer 100 mesh serta disimpan dalam wadah tertutup.

3. Ekstraksi

Serbuk daun cengkeh yang kering ditimbang 500 gram lalu diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter (1:10) selama 7 hari. Selama 5 hari menggunakan volume etanol yang digunakan yaitu 3.750 mL dan selama 2 hari diremaserasi menggunakan volume 1.250 mL. Bejana maserasi sesekali dilakukan pengadukan dan maserasi diulang sampai didapatkan filtrat. Filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary* evaporator pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.

Rumus rendamen :

$$\% \text{ Rendamen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{Bobot Simplisia awal (gram)}} \times 100\%$$

(Syamsul dkk., 2020)

4. Purifikasi

Pembuatan ekstrak purifikasi dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksana (non polar). Ekstrak daun cengkeh ditimbang 10 gram kemudian dilarutkan dengan 100 ml etanol 96% dan dimasukkan corong pisah. Setelah itu, ditambahkan 100 ml n-heksana pada ekstrak yang sudah ditambahkan etanol kemudian corong dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan dimana lapisan n-heksana akan berada dilapisan atas etanol. Purifikasi diulangi hingga lapisan n-heksana berubah warna menjadi bening yang menunjukkan sudah tidak ada pengotor. Hasil pemisahan ekstrak dikumpulkan dan dievaporasi dengan *Rotary evaporator* serta diuapkan pada penangas air sehingga mendapatkan ekstrak terpurifikasi (Luhurningtyas dkk., 2021).

5. Pengujian Kandungan Senyawa

a. Uji Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol pada ekstrak daun cengkeh dilakukan dengan cara mereaksikan kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$) dengan etanol dalam suasana asam. Jika larutan tidak mengandung etanol atau bebas etanol maka akan terbentuk warna campuran dari larutan ekstrak dan larutan kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$) yang ditambahkan asam sulfat (H_2SO_4), tetapi jika larutan mengandung etanol maka akan terbentuk warna biru.

b. Uji Flavonoid

Pengujian flavonoid pada ekstrak daun cengkeh dilakukan dengan dimasukkan 1 g ekstrak ke dalam tabung reaksi dan ditambah 10 mL air panas kemudian dididihkan dan disaring dalam keadaan panas. filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan dengan 0,1 g serbuk Mg, 1 mL HCl dan 2 mL amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Apabila terbentuk warna kuning, orange atau merah pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Ramadhani dkk., 2020).

c. Uji Alkaloid

Pengujian alkaloid pada ekstrak daun cengkeh dilakukan dengan tiga pereaksi, pertama pereaksi Mayer dengan menambahkan 3 tetes ekstrak daun cengkeh dan 2 tetes pereaksi Mayer, apabila terbentuk endapan putih atau kuning menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Kedua dengan pereaksi Bouchardat yaitu menambahkan 3 tetes ekstrak daun cengkeh dan 2 tetes pereaksi Bouchardat, apabila terbentuk endapan coklat sampai hitam menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Ketiga yaitu dengan pereaksi Dragendorff dilakukan dengan menambahkan 3 tetes ekstrak daun cengkeh dan 2 tetes pereaksi Dragendorff, bila terbentuk endapan jingga sampai merah coklat atau merah bata menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Ramadhani dkk., 2020).

d. Uji Tanin

Pengujian tanin pada ekstrak daun cengkeh dilakukan dengan dimasukkan 1 g ekstrak ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah

dengan 10 mL air suling lalu dihomogenkan dan disaring. Selanjutnya 2 mL filtrat ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida lalu apabila terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Ramadhani dkk., 2020).

e. Uji Steroid dan Triterpenoid

Pengujian steroid dan triterpenoid pada ekstrak daun cengkeh dilakukan dengan dimasukkan 30 g ekstrak ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan asam asetat glasial sebanyak 5 tetes dan asam sulfat pekat sebanyak 2 tetes. Setelah itu, apabila mengandung steroid terbentuk warna biru atau hijau sedangkan mengandung triterpenoid terbentuk warna merah atau ungu. (Ramadhani dkk., 2020)

f. Uji Saponin

Pengujian saponin pada ekstrak daun cengkeh dilakukan dengan dimasukkan 1 g ekstrak kemudian ditambahkan air panas 10 mL, dikocok selama 15 menit. Setelah itu, ditetesi asam klorida 2 N lalu apabila terbentuk buih permanen selama kurang lebih 10 menit maka menandakan positif adanya saponin (Ramadhani dkk., 2020).

6. Formulasi Ekstrak Daun Cengkeh

Tabel 3.2 Formula Lotion Ekstrak Purifikasi Daun Cengkeh (*Syzygium Aromaticum L*)

Bahan	Konsentrasi (%)				Range (%)	Fungsi
	F0	FI	FII	FIII		
Ekstrak Daun Cengkeh	-	0.5	1	1,5	0,5-10%	Zat aktif
Gliserin	5	5	5	5	2-15%	Humektan
TEA	2	2	2	2	2-4%	Pengemulsi
Asam Stearat	10	10	10	10	1-20%	Pengemulsi
Setil Alkohol	2	2	2	2	2-5%	Pengemulsi
Paraffin Cair	7	7	7	7	1-32%	<i>Emolient</i>
Nipagin	0,12	0,12	0,12	0,12	0,01-0,3%	Pengawet
Nipasol	0,12	0,12	0,12	0,12	0,01-0,6%	Pengawet
Aquadest ad	100	100	100	100	-	Pelarut

Keterangan : Formula *lotion* sumber (Ginaris., 2020)

a. Cara Pembuatan *Lotion*

Lotion dibuat 100g untuk setiap formula. Pembuatan *lotion* ekstrak daun cengkeh dilakukan dengan cara membuat campuran A terlebih dahulu dalam cawan penguap. Campuran A berisi fase minyak asam stearat, setil alkohol, nipasol dan paraffin cair yang dileburkan pada penangas air. Selanjutnya membuat campuran B yaitu, Gliserin dan TEA dimasukkan ke dalam *beaker glass* serta ditambahkan air panas lalu diaduk sampai homogen. Campuran C yaitu nipagin dilarutkan dengan air mendidih dan diaduk sampai larut. Campuran A dimasukkan ke dalam mortir yang telah dipanaskan. Kemudian Campuran B dimasukkan ke dalam mortir sedikit demi sedikit dan diaduk sampai muncul korpus emulsi. Campuran C ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam mortir dan diaduk sampai homogen.

Setelah itu, ekstrak purifikasi daun cengkeh dimasukkan ke dalam mortir dan diaduk sampai homogen serta sisa aquadest ditambahkan sampai homogen (Ginaris., 2020).

b. Karakteristik Fisik *Lotion*

1. Uji Organoleptik

Uji organoleptik yang diamati bentuk, bau, dan warna *lotion* yang memiliki variasi konsentrasi. Setelah itu, dicatat hasil evaluasi pengamatan sebagai pengukuran penerimaan terhadap sediaan *lotion* (Megantara dkk., 2017).

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara dioleskan *lotion* pada kaca transparan. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar serta dilakukan sekaligus uji tipe emulsi O/W dengan cara ditambahkan sejumlah air pada sediaan kemudian diaduk. Apabila sediaan tetap homogen maka sediaan termasuk tipe O/W (Megantara dkk., 2017).

3. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 1 gram sediaan *lotion* lalu diencerkan dengan 10 ml aquades. Kemudian digunakan pH meter untuk mengukur pH *lotion* (Megantara dkk., 2017).

4. Uji Daya Lekat

Uji daya sebar dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 0,25 g *lotion* diletakkan di titik tengah luasan gelas objek yang telah

ditandai dan ditutup dengan gelas objek lain. Setelah itu, diberi beban 1 kg selama 5 menit lalu kedua gelas objek yang telah saling melekat 1 sama lain dipasang pada alat uji yang diberi beban 80 gram. Setelah itu dicatat waktu yang diperlukan hingga terpisahnya 2 gelas objek tersebut (Megantara dkk., 2017).

5. Uji Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan dengan cara ditimbang 0,5 gram diletakan di tengah-tengah antara 2 lempeng gelas. Kemudian diberikan beban (50g, 100g dan 200g) dibiarkan 1 menit lalu diukur luas sebarannya (Megantara dkk., 2017).

6. Uji Viskositas

Uji Viskositas, dilakukan selama 14 hari pada hari ke-0, 7 dan 14. Pengujian viskositas ditentukan dengan viskometer Brookfield dengan spindle 64 dan kecepatan 50 rpm (Megantara dkk., 2017).

7. Uji Stabilitas Dipercepat

Uji stabilitas dipercepat dilakukan dengan cara menyimpan *lotion* pada suhu 4⁰C selama 24 jam kemudian dipindahkan ke dalam oven yang bersuhu 40⁰C juga selama 24 jam. Perlakuan ini terhitung 1 siklus dan dilakukan sebanyak 6 siklus (12 hari) (Wildaniah & Ganda, 2019).

8. Uji Sentrifugasi

Uji sentrifugasi dilakukan dengan 10 ml *lotion* berbagai variasi konsentrasi, kemudian dimasukkan kedalam tabung sentrifugasi. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, selama 2,5

jam dengan 5 kali pengulangan selang waktu 30 menit, kemudian diamati ada pemisahan fase minyak dan air serta diukur tinggi lotion (Rantika dkk., 2020)

7. Uji aktivitas *Antiacne*

a. Pembuatan Media Agar Miring

Nutrient agar sebanyak 0,56 g dilarutkan dalam 20 mL aquades (28g/1000mL) menggunakan *Erlenmeyer*. Setelah itu, dihomogenkan dengan *stirrer* diatas penangas air sampai mendidih. Sebanyak 5 mL dituangkan masing-masing pada 2 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama \pm 30 menit sampai media memadat pada kemiringan \pm 30⁰. Media agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Torar., 2017).

b. Inokulasi Bakteri Pada Media Agar Miring

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Torar., 2017).

c. Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan (Larutan *Mc. Farland*)

Larutan H₂SO₄ 0,36 N sebanyak 9,5 mL dicampurkan dengan larutan BaCl₂.2H₂O 1,175% sebanyak 0,5 mL dalam erlenmeyer, kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Hasil kekeruhan digunakan sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Suryani dkk., 2019).

d. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan jarum ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 mL larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland (Suryani dkk., 2019).

e. Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Difusi Cakram

Uji antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Media *Nutrient Agar* yang telah steril dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak \pm 20 ml dan dibiarkan memadat. Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* diinokulasikan pada seluruh permukaan media dengan menggunakan batang L. Kertas cakram yang telah direndam sekitar 10-25 menit pada *lotion* ekstrak purifikasi daun cengkeh pada konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5% kontrol positif (+) yaitu *lotion* Acnol dan kontrol negatif (-) yaitu menggunakan basis *lotion* tanpa ekstrak dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah terisi bakteri *Propionibacterium acnes*. Inkubasi media uji pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati dan diukur diameter zona hambat/bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong (Suryani dkk., 2019).

Cara menghitung diameter zona hambat dengan menggunakan rumus :

$$d = \frac{A+B}{2}$$

Keterangan : d = diameter zona hambat

 A = diameter vertikal

 B = diameter horisontal

Kriteria aktivitas daya hambat yang dikemukakan oleh zona hambat yang terbentuk ≥ 20 mm dianggap memiliki aktivitas daya hambat sangat kuat, 10-20 mm dinyatakan memiliki aktivitas daya hambat kuat, 5-10 mm dinyatakan memiliki aktivitas daya hambat sedang dan ≤ 5 mm dinyatakan memiliki aktivitas daya hambat lemah (Marselia dkk., 2015).

H. Analisa Data

Karakteristik fisik *lotion* ekstrak purifikasi daun cengkeh dianalisa data menggunakan SPSS dengan diuji normalitas dengan *Shapiro wilk*. Setelah itu, uji homogenitas dengan *Levene statistic*. Setelah data terdistribusi normal dan homogen kemudian data dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dan LSD. Aktivitas *lotion antiacne* menggunakan analisa data dengan uji *Kruskal wallis* dan *Mann whitney* karena data tidak terdistribusi normal dan homogen. Kedua metode ini digunakan untuk mengevaluasi karakteristik fisik dan aktivitas *lotion antiacne* ekstrak purifikasi daun cengkeh serta mengevaluasi konsentrasi efektif penghambat *Propionibacterium acne*.