

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Pada penelitian ini digunakan metode eksperimental laboratorium dengan menggunakan sampel buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda segar yang diambil dari pohonnya di desa Liman Sari, Sumatera Selatan, kemudian diamati karakteristik fisik sediaan dan penentuan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode cakram/disc diffusion (*test Kirby & Bauer*) untuk melihat aktivitas *antiacne* masker *peel-off* ekstrak etanol buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan cara mengukur besarnya diameter zona bening yang terbentuk disekitar cakram.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni – Agustus 2022, dimana determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas SAINS dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang, pembuatan ekstrak etanol buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda dilakukan di laboratorium fitokimia jurusan farmasi Universitas Ngudi Waluyo Semarang, pembuatan formulasi masker ekstrak etanol buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda dilakukan di laboratorium farmasetika jurusan farmasi Universitas Ngudi Waluyo Semarang dan pengujian

aktivitas antibakteri dilakukan di laboratorium Biomedik Terintegrasi FK Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

C. Subyek Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda dengan kriteria buah segar yang masih muda, belum mempunyai biji pada buahnya, berwarna hijau muda sampai hijau tua, dan dengan kisaran berat 50-200 g yang diperoleh dari daerah desa Liman Sari, Sumatera Selatan. Sampel diambil sebanyak 5 kg untuk keperluan uji yang dilakukan pada sediaan.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Adapun alat-*alat* yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beaker (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), cawan petri (Anumbra), tabung reaksi (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), pinset (Renz), batang pengaduk (Iwaki), spatula (Rofa), lampu spiritus, jarum ose, kapas steril, kaca arloji (Rofa), pH meter (Ohaus Starter 300), pipet tetes, corong (Pyrex), pisau, timbangan analitik (Ohaus PX224), kertas timbang, waterbath DWB 6 L, penjepit kayu, jangka sorong (Mitutoyo Dial Caliper), oven (Binder), vacuum rotary evaporator (IKA RV 10), kaca preparat, Viskometer (Brookfield DV2T), penangas, corong buchner (Pyrex), aluminium foil, kertas saring (whatman), spatula, sendok tanduk, dan toples maserasi.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda, etanol teknis, aquadest, FeCl₃ 5%, FeCl₃ 10%, *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), *mueller hinton agar* (MHA), bakteri *Propionibacterium acnes*, *Polyvinil alcohol* (PVA), *Hydroxypropyl methylcellulose* (HPMC), propilen glikol, dan nipagin.

E. Prosedur penelitian

1. Pengumpulan Bahan

Buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda yang diambil dari pohonnya di desa Liman Sari, Sumatera Selatan.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman adalah pemberian nama latin dan suku atau famili suatu organisme berdasarkan literatur (Purnamasari *et al.*, 2012). Pada penelitian ini jenis tanaman yang diambil menjadi sampel dicocokkan dengan literatur dengan melihat persamaan jenis dan ciri-ciri tanaman tersebut. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas SAINS dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

3. Penyiapan Bahan

Buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda segar yang diperoleh di daerah Sumatera Selatan, dicuci dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan cemaran lain yang masih menempel pada buah. Kemudian, buah nangka (*Artocarpus heterophyllus*

lamk.) muda ditempatkan pada nampan untuk ditiriskan dan diangin-anginkan, setelah itu dilakukan perajangan dalam bentuk yang tipis agar mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya dilakukan proses penjemuran dibawah sinar matahari selama 3 hari dan dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C. Pengeringan dilakukan hingga kadar air kurang dari 10% atau sampai mudah untuk dihancurkan ketika diremas. Tujuan dari pengeringan adalah mencegah pertumbuhan jamur atau mikroorganisme. Setelah didapatkan simplisia yang kering, maka simplisia diblender dan diayak menggunakan ayakan nomor mesh 40/80, artinya serbuk dapat melalui pengayak no 40 seluruhnya dan tidak lebih dari 40% melalui pengayak nomor 80. Serbuk yang partikelnya belum halus diblender dan kemudian diayak kembali.

4. Pembuatan Ekstrak

Serbuk buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda ditimbang sebanyak 500 g, dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol sebanyak 5 liter (perbandingan bubuk buah nangka muda dengan etanol yaitu 1:10) selama 5 hari. Selama proses maserasi, dilakukan penggojokan manual setiap 8 jam sekali selama 5 menit. Proses maserasi dilakukan pada suhu ruang (28-29°C) dalam kondisi botol gelap dan tertutup rapat untuk mencegah reaksi yang dikatalisis oleh cahaya sehingga terjadi perubahan warna (Zulharmitta *et al.*, 2013). Setelah maserasi larutan disaring kemudian filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* suhu 50°C, dan ekstrak pekat etanol yang diperoleh dipekatkan kembali menggunakan

waterbath pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak bebas dari pelarut etanol. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk dihitung rendemen ekstraknya kemudian ditempatkan di dalam botol gelap, untuk selanjutnya dilakukan analisis skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri (Widhiana Putra *et al.*, 2020).

5. Uji Skrining Fitokimia

a. Saponin

Ekstrak etanol buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda ditambah 10 mL aquades, kemudian dikocok kuat-kuat. Jika muncul busa yang stabil maka positif mengandung saponin (Ergina *et al.*, 2014).

b. Flavonoid

Ekstrak etanol buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi. Tabung I ditetesi NaOH 10%, apabila menghasilkan larutan berwarna biru violet maka positif mengandung flavonoid. Tabung II ditambah serbuk Mg dan HCl pekat, apabila menghasilkan larutan berwarna jingga maka positif mengandung flavonoid (Ergina *et al.*, 2014).

c. Tanin

Ekstrak etanol buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan FeCl₃ 1%. Apabila menghasilkan larutan berwarna biru kehitaman maka positif mengandung tanin (Ergina *et al.*, 2014).

d. Polifenol

Ekstrak etanol buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda ditambahkan dengan 1 mL larutan Fe(III) klorida 10%. Jika terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol (Susanti *et al.*, 2015).

6. Formulasi Masker Dari Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda

Tabel 3. 1. Formula Masker Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda (Silvia *et al.*, 2015).

Bahan / Formula	Konsentrasi (%)			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak	-	1	2,5	5
PVA (Polyvinil alcohol)	12	12	12	12
HPMC	3	3	3	3
Propilen glikol	10	10	10	10
Nipagin	0,2	0,2	0,2	0,2
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

a. Pembuatan Variasi Konsentrasi

Ekstrak etanol buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda dibuat dalam berbagai konsentrasi dengan menimbang ekstrak sebanyak 1 ; 2,5 ; dan 5 g, kemudian masing-masing dilarutkan dengan basis masker ad 100 g. Konsentrasi ekstrak adalah 1, 2,5 dan 5 % ini mengacu pada penelitian yuniarni pada tahun 2014 yang mengambil ketiga konsentrasi tersebut untuk melihat aktivitas antibakteri buah nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) muda terhadap *Escherichia coli* dan termasuk kategori kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri (Yuniarni *et al.*, 2014).

b. Pembuatan Masker

HPMC ditimbang sebanyak 3 g, kemudian dikembangkan dalam aquadest sebanyak 12 mL pada suhu (80-90°C) kemudian dihomogenkan menggunakan mortir dan stamper hingga mengembang dan terbentuk massa gel. PVA ditimbang sebanyak 12 g, dilarutkan dalam aquadest 48 mL pada suhu (80-90°C) kemudian dihomogenkan menggunakan mortir dan stamper hingga mengembang dan terbentuk massa gel. Campuran HPMC dan PVA dihomogenkan menggunakan mortir dan stamper, kemudian sisa air ditambahkan. Propilen glikol ditambahkan sebanyak 10 g dan nipangin sebanyak 0,2 g. Ekstrak dihaluskan dengan cara digerus menggunakan mortir dan stamper kemudian ditambahkan dan dihomogenkan. Perlakuan yang sama dilakukan untuk variasi F1, F2 dan F3.

7. Evaluasi Masker Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda

a. Organoleptik sediaan

Pengamatan ini dilakukan dengan menggunakan panca indera untuk mengetahui bentuk, warna, dan bau sediaan.

b. Viskositas

Pengujian dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield LV dengan cara sampel sebanyak 150 mL disimpan dalam wadah lalu *spindle* nomor 64 diatur dan dicelupkan ke dalam sampel hingga tanda batas. Kemudian kecepatan diatur dan nilai dari viskositas akan terbaca.

Nilai viskositas yang baik berada pada rentang 5000-50.000 cPs (Silvia *et al.*, 2015).

c. Daya sebar

Pengujian dilakukan dengan 0,5 g masker *peel-off* diletakkan pada kaca bulat dengan diameter 15 cm dan ditutup dengan kaca bulat lagi di atasnya. Kemudian diletakkan beban seberat 50 mg dan didiamkan selama 1 menit. Diameter yang dihasilkan diukur melalui 4 sisi dan dihitung rata-ratanya, lalu dicatat. Hal yang sama juga dilakukan dengan penambahan beban kelipatan 50 mg, yaitu 100mg, 150 mg, 200 mg, dan 250 mg (Garg *et al.*, 2002). Nilai daya sebar yang baik berada pada rentang 5-7 cm (Silvia *et al.*, 2015).

d. Daya lekat

Pengujian ini dilakukan menggunakan alat daya lekat dimana masker *peel-off* diletakkan di kaca datar kemudian diletakkan plastik mika di atasnya lalu diberi beban 100 g selama 5 menit. Lalu beban tersebut diangkat kemudian kaca datar dan plastik mika yang berlekatan dilepaskan sambil dicatat waktu yang dibutuhkan sampai kaca datar dan plastik mika terlepas (Liza *et al.*, 2018). Sediaan dikatakan baik apabila memiliki daya lekat lebih dari 4 detik (Silvia *et al.*, 2015).

e. Waktu mengering

Pengujian dilakukan dengan mengamati waktu yang dibutuhkan masker *peel-off* untuk mengering yang dilakukan dengan cara mengoleskan masker *peel off* sebanyak 0,5 g pada kaca kemudian

dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 37°C lalu dihitung waktu mengering masker menggunakan stopwatch. Waktu mengering yang baik adalah tidak lebih dari 30 menit setelah diaplikasikan ke kulit (Silvia *et al.*, 2015).

f. pH

Pengujian dilakukan dengan menggunakan pH meter pada suhu ruang yang telah dikalibrasi sebelumnya. Masing-masing formula dibuat larutan dengan konsentrasi 1%, yaitu dengan cara melarutkan 100 mg sediaan dalam 10 mL aquadest pada *beaker glass*. Elektroda pada larutan pH 4, 7 dan 10 dicelupkan ke dalam beaker glass tersebut dan secara otomatis pH meter akan menunjukkan angka yang merupakan pH sediaan, hasil yang diperoleh kemudian dicatat. Nilai pH yang seimbang dari sediaan masker *peel-off* adalah antara 4,5-8 (Partuti *et al.*, 2021).

g. *Cycling Test*

Pengujian dilakukan dengan menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 24 jam lalu dipindahkan ke dalam *climatic chamber* bersuhu 40° ± 2°C selama 24 jam (satu siklus). Uji dilakukan sebanyak 6 siklus, kemudian diamati karakteristik fisik sediaan yang meliputi organoleptis, daya sebar, daya lekat, pH, dan viskositas kemudian hasilnya dibandingkan dengan karakteristik fisik pada awal formulasi.

h. Uji Sineresis Gel (72 jam)

Sineresis dihitung berdasarkan penyusutan berat yang terjadi selama penyimpanan pada suhu ±10 °C selama 24, 48 dan 72 jam. Masing-

masing formula ditempatkan pada pot untuk menampung air yang dibebaskan dari dalam gel selama penyimpanan (Sri Kuncari *and* Praptiwi, 2014).

8. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA dibuat dengan melarutkan sebanyak 17 g MHA ke dalam 500 mL aquadest pada erlenmeyer dengan kapasitas 500 mL. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C.

b. Pembuatan media agar

20 mL media MHA dimasukkan ke dalam cawan petri, lalu disimpan di dalam *freezer* dan di inkubasi dalam inkubator suhu 37°C.

c. Pembuatan Media BHI (*Brain Head Infussion*) dan Kultur Bakteri

Media BHI dibuat dengan melarutkan sebanyak 18,5 g BHI ke dalam 500 mL aquadest pada erlenmeyer dengan kapasitas 500 mL. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C, setelah larutan dingin ditambahkan ATTC *Propionibacterium Acnes* dan disimpan selama 24-48 jam di dalam toples anaerobik jar yang di dalamnya terdapat anaerobik kit untuk menangkap oksigen.

d. Pembuatan suspensi bakteri

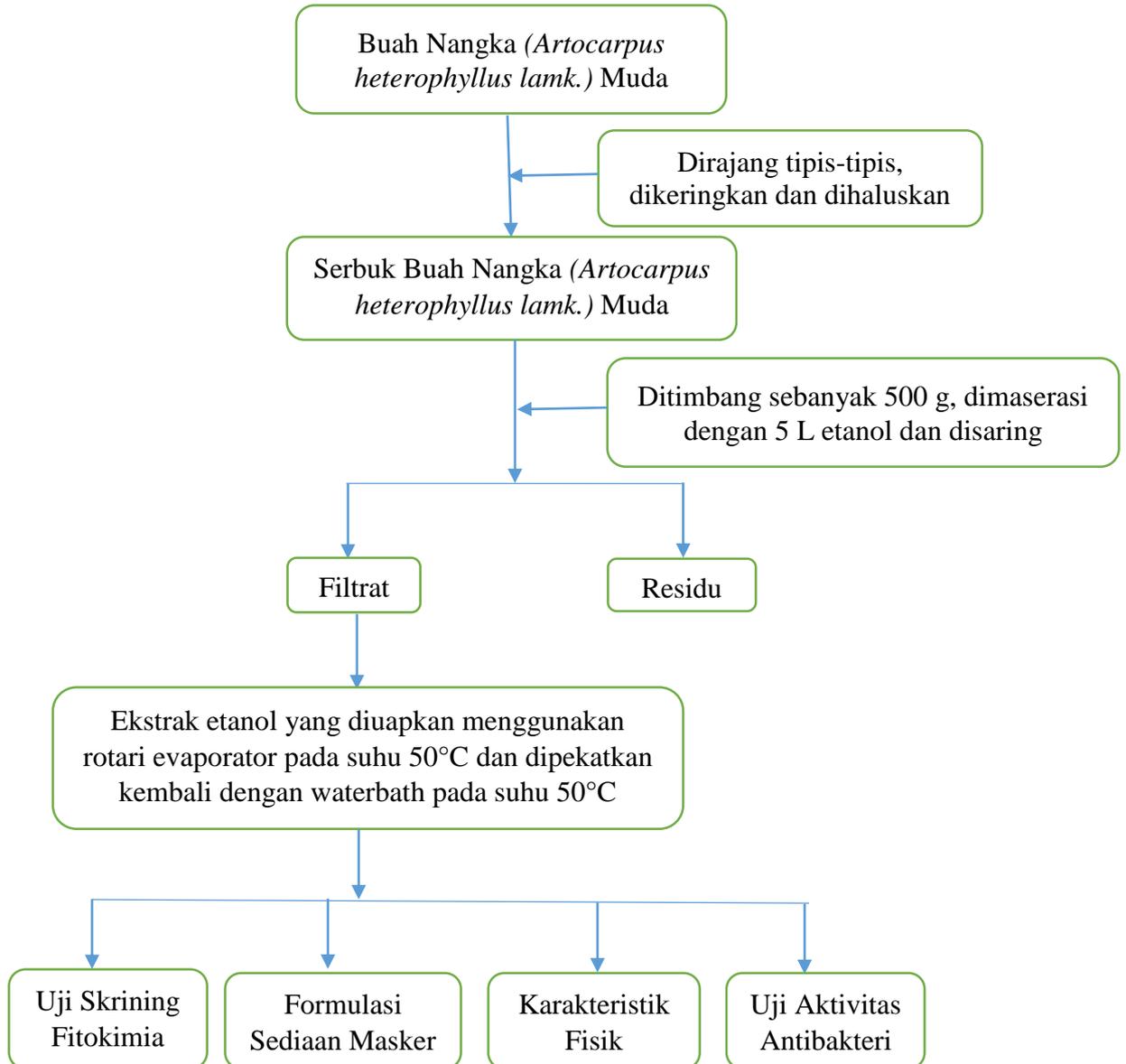
Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil kultur bakteri sebanyak 500 mikron dan ditambahkan NaCl sampai larutan memiliki tingkat kekeruhan yang sama dengan standar Mc.Farland 0,5.

e. Uji Aktivitas Antibakteri

Kertas cakram yang akan digunakan direndam ke dalam sampel masker *peel-off* sampai seluruh bagian kertas cakram terendam dalam waktu kurang lebih 10-15 menit, selanjutnya dilakukan penggoresan suspensi bakteri ke dalam media agar menggunakan jarum ose steril yang sudah diinkubasi dan di tunggu sampai kering. Kertas cakram diambil dan diletakkan ke media agar tersebut, lalu media agar disimpan dalam anaerobik jar dan dimasukkan ke dalam inkubator suhu 37°C. Zona hambat bakteri *Propionibacterium Acnes* dapat diamati setelah penyimpanan 24-48 jam.

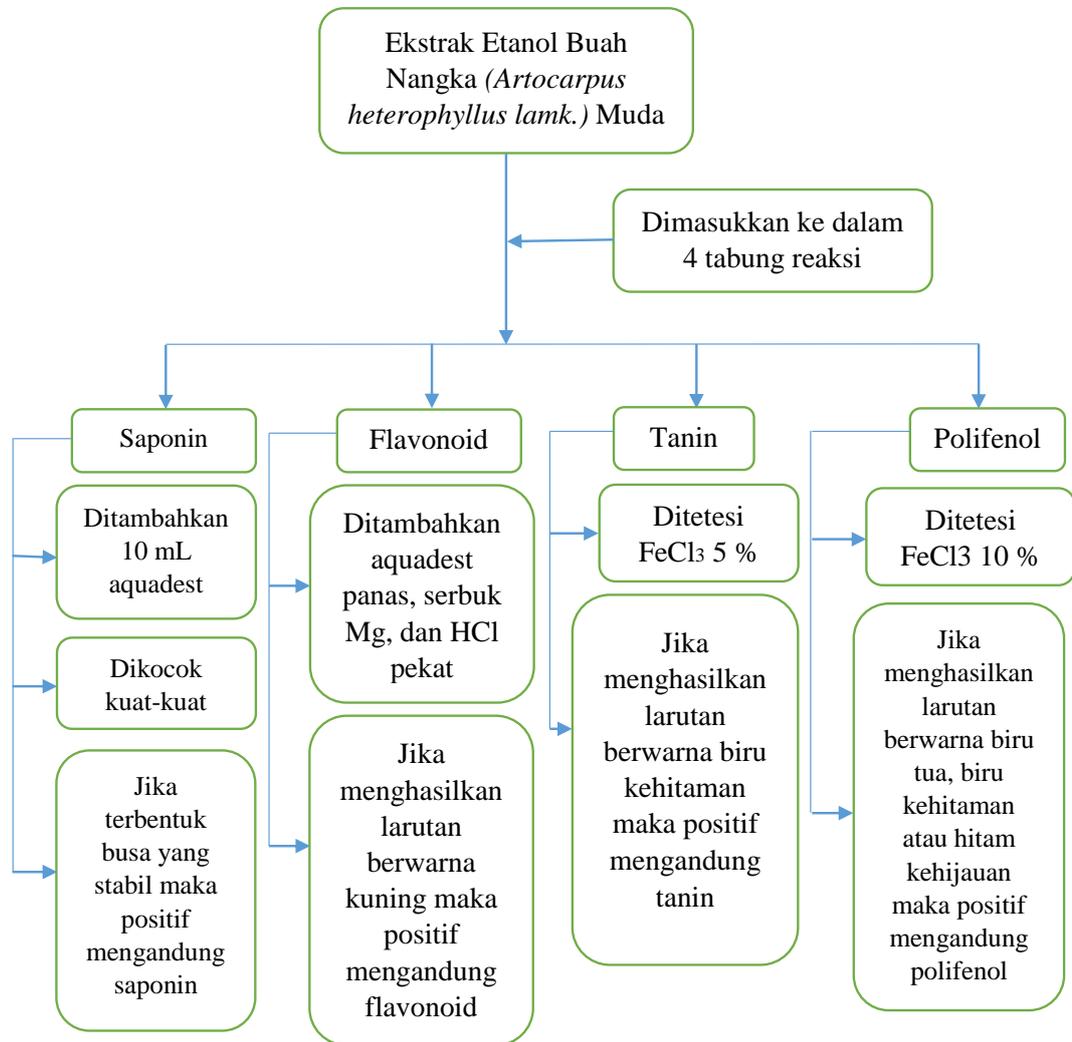
F. Bagan Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda



Gambar 3. 1. Alur Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda

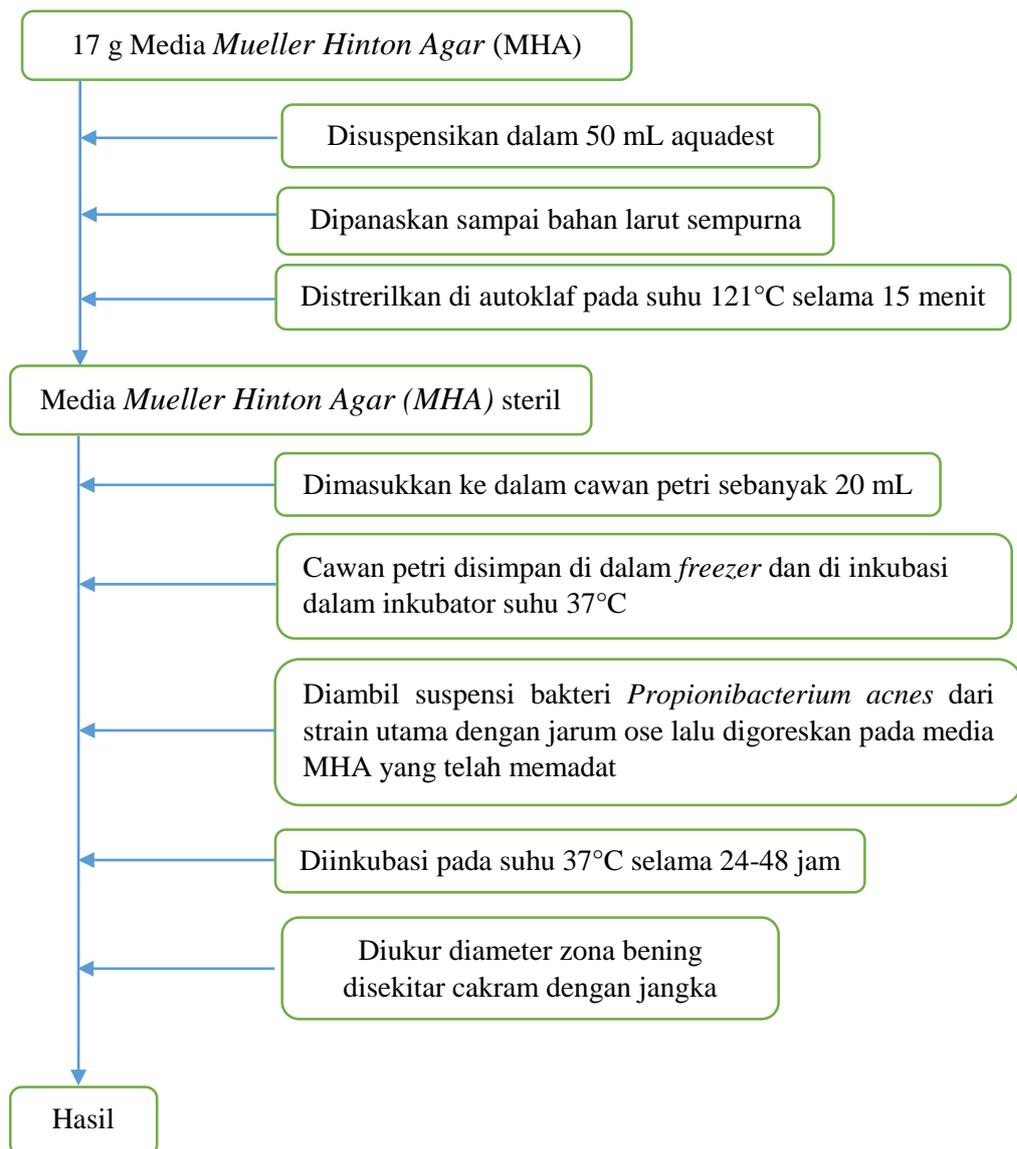
2. Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda



Gambar 3. 2. Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda

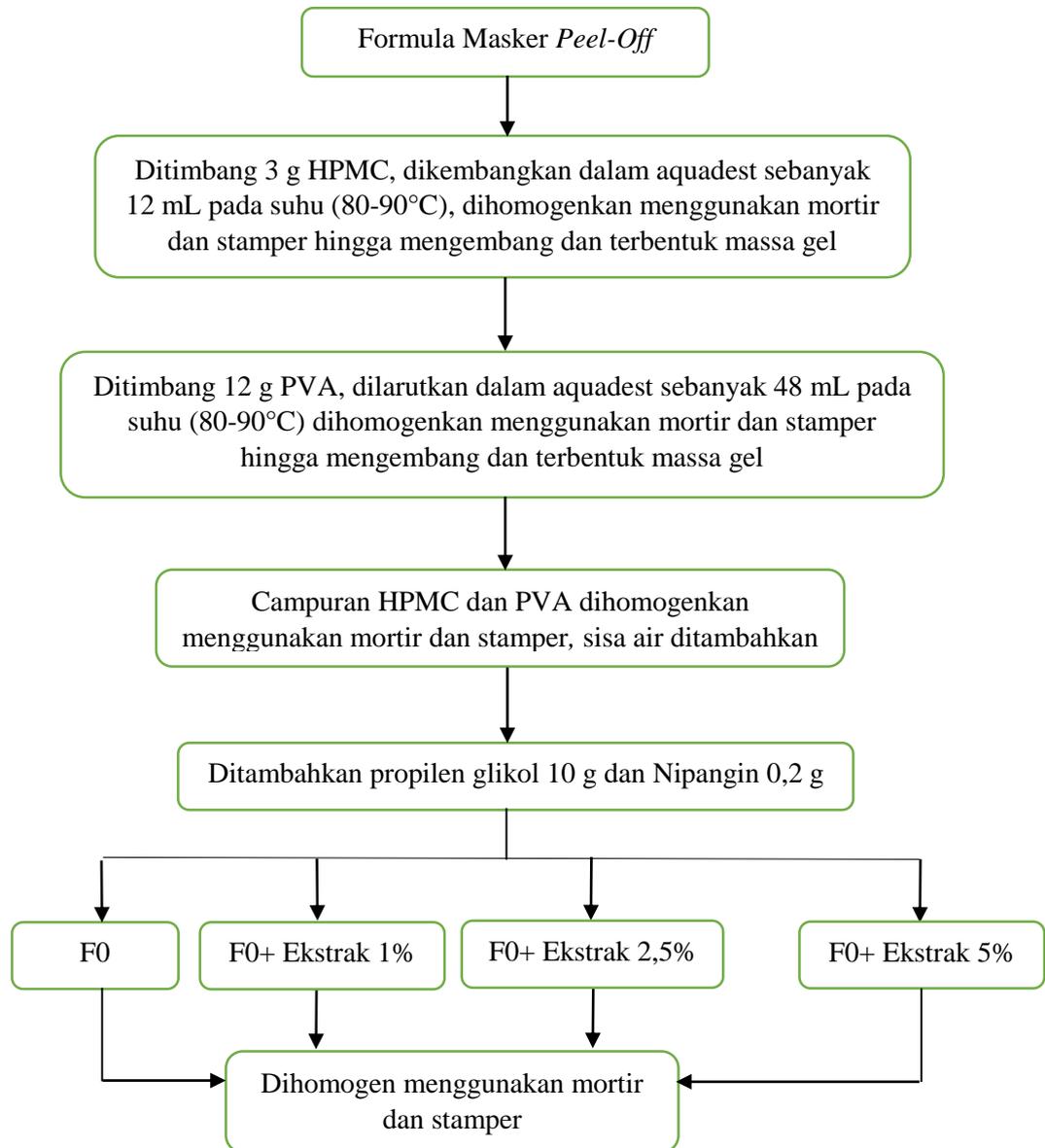
3. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda

a. Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda



Gambar 3. 3. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda

b. Pembuatan Masker



Catatan : Dilakukan hal yang sama pada variasi F2 dan F3

Gambar 3. 4. Pembuatan Masker Ekstrak Etanol Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus lamk.*) Muda

G. Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis secara deskriptif. Untuk hasil data sifat fisik sediaan (pH, viskositas, waktu sediaan mengering, daya lekat, dan daya sebar) dan pengujian aktivitas antibakteri dianalisis dengan menggunakan *One Way ANOVA LSD*, sedangkan untuk data hasil *test cycling* dan sineresis dianalisa menggunakan *Paired Samples t-test*.

