

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental, buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) diekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol. Kemudian hasil dari ekstraksi akan dibuat menjadi *facial wash* gel ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) dan diuji stabilitas fisik sediaan *facial wash* gel ekstrak etanol buah parijoto dengan pengujian organoleptis, homopogenitas, pH, viskositas, tinggi busa dari sediaan *facial wash* gel setelah itu dilakukannya uji aktivitasnya terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi cakram.

A. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik MIPA di Universitas Diponegoro Semarang
2. Pembuatan ekstrak etanol buah parijoto dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
3. Uji organoleptis, uji viskositas, uji daya busa, uji pH, uji stabilitas sediaan di laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
4. Uji anti bakteri menggunakan metode difusi cakram akan dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

B. Subjek Penelitian

Pada penelitian ini digunakan populasi dan sampel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) yang didapatkan dari Desa Colo Kota Kudus Jawa Tengah dan di lakukan pengujian antibakteri menggunakan metode difusi cakram.

C. Definisi Operasional

Propionibacterium acnes merupakan bakteri gram positif yang dapat menginfeksi kulit. *Propionibacterium acnes* dapat menyebabkan infeksi oportunistik berupa jerawat (Pariury *et al.*, 2021).

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini ialah konsentrasi ekstrak buah parijoto dalam formula *facial wash* gel pada pengujian bakteri *Propionibacterium acnes*.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat itu adalah variabel yang di pengaruhi akibat dari adanya variabel bebas pada zona hambat bakteri *Propionibacterium acnes*.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol adalah variabel yang sengaja dikendalikan pada *facial wash* pengujian organoleptis dan homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji tinggi busa yang harus sesuai standar.

D. Pengumpulan Data

1. Alat Penelitian

Alat yang di gunakan untuk pembuatan *facial wash* gel anti jerawat yaitu oven (*biobased*), lemari pendingin (*sharp*), blender, alat-alat gelas, kaca arloji, lampu UV, mikropipet, cawan porselen, batang pengaduk, mortir dan lumpang, pH meter, *viscometer*

Brookfield, corong kaca, kertas saring, sudip, botol *facial wash*, sepaket alat difusi cakram dan elemeyer 250 ml, *rotary evaporator* (Wulandari *et al.*, 2021).

2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan antara lain buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*), carbopol 940 (PT. Bratachem), trietonamin (PT. Bratachem), natrium laurat sulfat (PT. Bratachem), propilen glikol (PT. Bratachem), natrium benzoat (PT. Bratachem) aquadest etanol 96% (toko kimia indrasari), kapas steril, alumunium foil, media nutrien agar.

E. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

2. Penyiapan Bahan

Buah parijoto (*Medinilla speciosaa Blume*) yang di peroleh selanjutnya di lakukan sortasi basah. Buah parijoto lalu setelah buah mengering dilakukan sortasi kering dan kemudian di haluskan dengan blender, setelah diblender didapatkan serbuk halus kemudian di ayak menggunakan pengayak nomor 40 mesh kemudian di lakukan ekstraksi (Niswah, 2014).

3. Ekstraksi

Serbuk simplisia buah parijoto diekstraksi dengan cara di maserasi, yaitu dengan cara ditimbang sebanyak 308 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam masing-masing toples kaca maserasi dilakuakan dengan menggunakan pelarut etanol 96% pelarut yang digunakan yaitu dengan perbandingan (1:10) maserasi dilakukan selama 3 hari dan

dilanjutkan dengan remaserasi selama 2 hari (Farida *et al.*, 2021). Maserasi dilakukan pada ruangan yang terlindungi dari cahaya matahari dan dilakukan pengadukan sesering mungkin. Hasil ekstrak yang diperoleh dari maserasi disaring menggunakan kain flanel. Setelah dilakukan penyaringan maserasi yang pertama setelah itu dilakukan remaserasi atau pengulangan. Hasil dari maserasi dan remaserasi dikumpulkan, diperoleh filtrat buah parijoto. Kemudian maserat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50⁰C untuk menghilangkan pelarut yang masih ada pada ekstrak kemudian dikentalkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50⁰C (Farida *et al.*, 2021).

4. Uji Kadar Air Ekstrak

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara cawan porselin dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105⁰C selama 1 jam kemudian di timbang cawan porselin yang kosong setelah itu ditimbang ekstrak sebanyak 2 gram dan dimasukan kedalam oven dengan suhu 105⁰C selama 3 jam. Kemudian sampel didinginkan didalam desikator selama 20 menit dan ditimbang bobotnya (Azizah & Salamah, 2013).

5. Skrining Fitokimia

a. Identifikasi flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara mengambil 0,1 gram ekstrak di tambah dengan 10 ml aquadest lalu dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring kedalam tabung reaksi. Ditambahkan dengan 0,5 mg serbuk MgSO₄ dan 1 ml HCl kemudian dikocok dengan kuat. Hasil positif dapat ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada larutan sampel (Toni *et al.*, 2022).

b. Identifikasi tanin

Uji tanin dilakukan dengan menggunakan larutan FeCl_3 ditimbang sampel sebanyak 0,5 gram, selanjutnya dilarutkan dengan menggunakan pelarut 5 ml aquadest yang telah dipanaskan sebelumnya. Larutan tersebut kemudian dipanaskan selama 15 menit dan selanjutnya disaring menggunakan kertas saring. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambah larutan FeCl_3 1% sebanyak 2-3 tetes. Apabila warna sampel berubah menjadi kehitaman atau biru tua, maka sampel tersebut mengandung senyawa tanin (Niswah, 2014).

c. Identifikasi saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 ml aquadest lalu dipanaskan selama 5 menit kemudian di saring menggunakan kertas saring masukan kedalam tabung reaksi, selanjutnya tambahkan dengan 4 tetes HCl lalu dikocok kuat. Hasil positif dari uji saponin ditandai dengan terbentuknya busa stabil selama 10 menit (Niswah, 2014).

6. Formulasi

Formulasi pembuatan sediaan *facial wash* gel dapat dilihat pada tabel 3.1

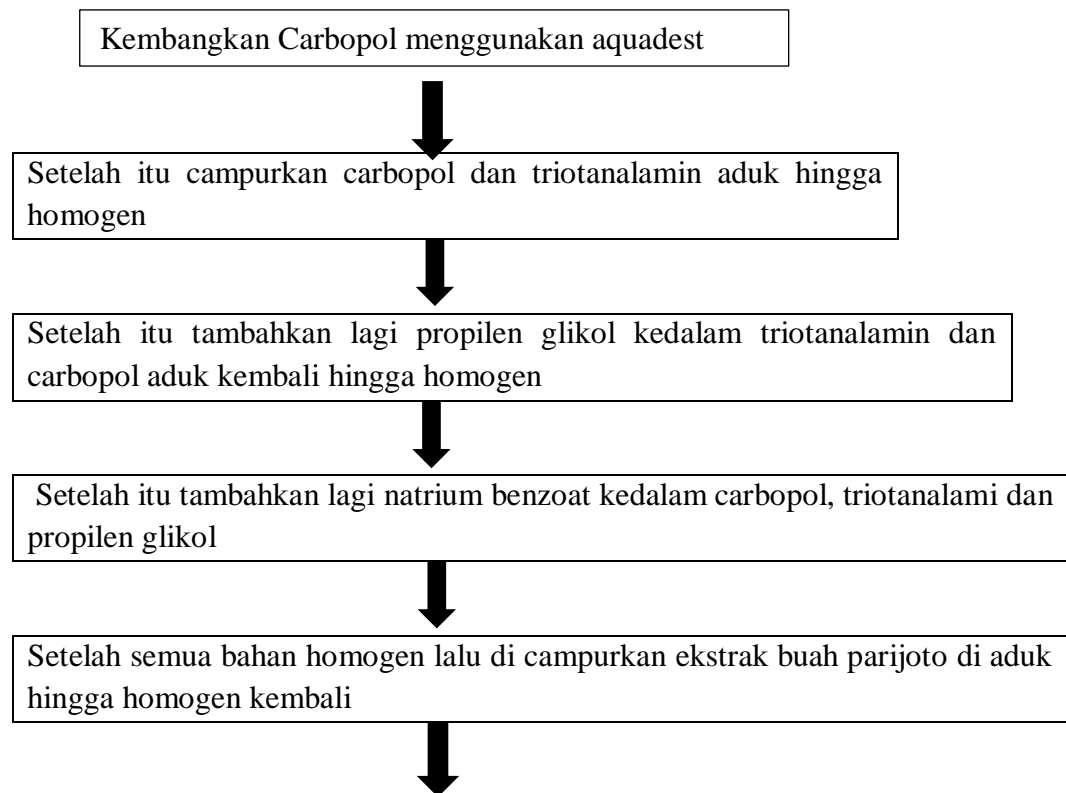
Tabel 3. 1 Formilasi sediaan *facial wash* anti acne

Bahan	Konsetrasi		
	F1	F2	F3
Ektrak buah parijoto	0,5	1	1.5
Karbopol 940	1	1	1
Triotanalamin	2	2	2
Natrium lauril sulfat	3	3	3
Propileng glikol	5	5	5
Natrium benzoate	0,5	0,5	0,5
Aquadest	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml

(Nabila *et al.*, 2020)

7. Pembuatan *Facial Wash* Ekstrak buah parijoto

Proses pembuatan diawali dengan penimbangan bahan-bahan yang akan digunakan dalam pembuatan sediaan *facial wash* gel ekstrak buah parijoto. Bahan yang akan digunakan yaitu triotanalamin, propilen glikol, dan aquadest dan bahan dalam bentuk serbuk yaitu SLS (*sodium lauryl sulfat*) natrium benzoat, carbopol, pada sediaan carbopol di kembangkan dengan cara dituang air panas ke dalam serbuk carbopol lalu didiamkan selama 24 jam. Setelah carbopol mengembang ditambah triotanalamin dan propilen glikol dilakukan pengadukan menggunakan *homogenizer* hingga terbentuk masa gel setelah itu natrium benzoat dilarutkan dalam 10 ml aquadest dimasukan sedikit demi sedikit kedalam masa gel dengan pengadukan menggunakan *homogenizer* ditambahkan ekstrak buah parijoto diaduk hingga homogen yang terakhir ditambahkan SLS (*sodium lauryl sulfat*) diaduk perlahan dengan konsisten (Nabila *et al.*, 2020).



Setelah ekstrak buah parijoto tercampur merata lalu tambahkan SLS aduk perlahan hingga homogen



Jika semuanya sudah homogen tercampur merata lalu dimasukkan ke dalam botol *facial wash* gel dan di lakukan uji stabilitas fisik dan ulangi pembuatan sebanyak 3 replikasi

(Nabila *et al.*, 2020).

Bagan 3. 1 Formulasi sediaan facial wash anti acne

8. Pengujian stabilitas fisik

Uji stabilitas dipercepat yaitu dimana sampel disimpan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam dan $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (1 siklus) dilaksanakan selama 5 siklus lalu diamati organoleptis, homogenitas, pH, stabilitas busa dan bentuk sediaan, setiap sediaan dilakukan pengujian selama 2 hari sekali (Tomi & Indawati, 2020). Uji stabilitas dipercepat untuk menentukan nilai kestabilan suatu sediaan farmasetika atau kosmetik dalam waktu yang singkat. Pengujian ini dimaksudkan untuk memperoleh informasi yang diinginkan dalam waktu sesingkat mungkin dengan cara menyimpan sampel pada kondisi yang di rancang untuk mempercepat terjadinya perubahan yang biasa terjadi pada kondisi normal. Pengujian yang dilakuakn untuk stabilitas sifat fisik *facial wash* gel (Karundeng, 2019).

a. Uji organoleptis

Uji ini dapat di lakukan dengan melihat bentuk, bau dan warna dari sediaan sabun wajah yang telah di buat sebelumnya (Nabila *et al.*, 2020).

b. Uji pH

Uji pH di lakukan dengan menggunakan pH kertas lakmus dengan cara menyelupkan kertas lakmus kedalam sediaan setelah itu dilihat warna kertas lebih cocok di warna pada pH tersebut (Nabila *et al.*, 2020).

c. Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan mengambil sedikit hasil sediaan yang telah dibuat dan dimasukkan kedalam kaca objek dan dilihat dibawah cahaya (Nabila *et al.*, 2020).

d. Uji viskositas

Uji ini dilakukan dengan memakai alat *viscometer brookfield* dengan mengambil sediaan yang telah dibuat dan diambil 10 ml lalu di masukan kedalam bekker glas 500 ml dan kemudian pasang spindel no 64 lihat dan cacat hasil yang di peroleh (Nabila *et al.*, 2020).

e. Uji tinggi busa

Uji ini dilakukan dengan mengambil sediaan sebanyak 1 ml dan kemudian ditambahkan dengan 9 ml aquadest, kemudian di kocok dengan *vortex* selama 2 menit amati hasil tinggi busa nya, ukur tinggi busa dengan menggunakan penggaris (Nabila *et al.*, 2020).

9. Identifikasi Bakteri *Propionibacterium acnes*

Identifikasi bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan pemeriksaan langsung pewarnaan gram. Perlakuan yang dilakukan yaitu, kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen, kemudian diambil bakteri dengan jarum ose secara aseptik dan dioleskan pada kaca objek lalu ditesis dengan gram A (ungu violet) dan dibiarkan selalam 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Bakteri tersebut ditetesi lagi dengan gram B (larutan iodine) dan dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering.

Selanjutnya ditetesi lagi dengan gram C (alkohol) didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir, dianginkan dan dikeringkan setelah itu dilakuakn penetes gram D (safranin) selama 1 menit setelah itu dicuci dengan air mengalir dikeringkan lalu dilakukan pengamatan dibawah misroskop (Suparyanto 2020).

Warna bakteri mengandung kristal violet, sewaktu proses pewarnaan gram. Bakteri jenis ini akan berwarna ungu di bawah mikroskop, sedangkan pada bakteri gram negatif berwarna merah, karena warna ungu dapat dilunturkan mengikat cat gram D sebagai warna kontras. Perbedaan klasifikasi antara gram positif dan negatif adalah didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri (Farida *et al.*, 2021).

10. Uji aktivitas antibakteri *facial wash* ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)

a. Sterilisasi alat

Langkah pertama yang dilakukan yaitu mencuci terlebih dahulu alat yang akan digunakan kemudian dikeringkan. Untuk alat non gelas disterilkan menggunakan autoklaf dalam waktu 15 menit dengan suhu 121⁰C. Kemudian untuk alat-alat gelas dibungkus menggunakan kertas HVS. Kemudian disterilkan menggunakan oven selama 2 jam pada suhu 160-180⁰C (Fajeriyati, 2017)

b. Pembuatan media NA

NA sebanyak 5 gram dilarutkan dalam 250 ml aquadest menggunakan erlemeyer dipanaskan menggunakan hot plat. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 15 menit, (Niswah, 2014).

c. Penanaman bakteri

Penanaman bakteri uji pada media agar miring kultur bakteri *Propionibacterium acnes* diambil menggunakan jarum ose. Kemudian bakteri digoreskan pada media agar miring secara zig-zag dari bawah sampai atas. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Farida *et al.*, 2021).

d. Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara diambil sebanyak 1 ose bakteri *Propionibacterium acnes* dimasukan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9% hingga terdapat kekeruhan pada larutan NaCl dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C (Hafsari *et al.*, 2015).

e. Proses Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri yang pertama menyiapkan cawan petri steril kemudian masing-masing cawan petri diberi garis 3 bagian untuk cawan pengujian formulasi dan diberi 2 garis untuk cawan pengujian kontrol positif dan kontrol negatif setelah itu menuangkan media NA sebanyak 10 ml kedalam cawan petri dan biarkan media NA hingga memadat selama 15 menit, dilakukan perendaman kertas cakram pada masing-masing formula sebanyak 1 gram, kertas cakram di rendam selama 15 menit.

Setelah itu dilakukan proses memipet suspensi bakteri menggunakan mikropipette sebanyak 100 µl mikro liter dan digoyang-goyangkan cawan petri searah jarum jam untuk menghasilkan bakteri tersebar merata pada media NA. Setelah itu diletakan kertas cakram yang sudah direndam pada masing-masing formulasi diatas media agar yang telah dituang bakteri *Propionibacterium acnes* dengan pengulangan sebanyak 3 kali setelah itu cawan petri ditutup dan indinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam dengan posisi tutup cawan terbalik (Niswah, 2014).

f. Pengamatan hasil aktivitas antibakteri

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam pada masa inkubasi. Adanya aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar cakram yang menandakan adanya efek hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* pengukuran zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong untuk mengetahui seberapa luas diameter zona hambat yang dihasilkan (Niswah, 2014).

F. Analisis Data

Dalam penelitian ini dilakukan analisis deskriptif yaitu uji organoleptis, uji aktivitas antibakteri formulasi *facial wash* gel ekstrak buah pariijoto data yang di peroleh dengan menggunakan metode difusi cakram yaitu besarnya diameter zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* berupa zona bening pada media.

Analisis data diameter zona hambat dilakukan dengan perangkat lunak SPSS. Untuk mengetahui data penggunaan uji saphiro-wik karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel. Data di katakan terdistribusi normal $p > 0,05$ dan data dikatan tidak terdistribusi normal jika $p < 0,05$. Kemudian di lanjutkan uji Levene'stest yaitu untuk mengetahui homogenitas data. Data dikatakan homogen jika $p > 0,05$ dan data dikatakan tidak homogen jika $p < 0,05$. Data yang terdistribusi normal dan fariannya homogen dianalisis menggunakan uji statistik One Way Anova dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Different*).