

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental, daun sirih (*Piper betle* L.) di ekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol 96%. Kemudian hasil dari ekstraksi dibuat menjadi sediaan bedak tabur dengan pengujian organoleptis, homogenitas dan derajat halus dari sediaan bedak tabur dengan variasi konsentrasi ekstrak 1%, 2% dan 3%, setelah itu dilakukan uji aktivitasnya terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan metode difusi cakram.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman daun sirih hijau dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro
2. Pembuatan ekstrak etanol daun Sirih hijau dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
3. Pembuatan sediaan bedak tabur ekstrak daun sirih hijau dan evaluasi sediaan dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Universitas Ngudi Waluyo
4. Uji antibakteri menggunakan metode difusi cakram dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

C. Subjek Penelitian

. Subjek pada penelitian ini adalah formulasi sediaan bedak tabur ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang didapatkan dari Di Desa Bungin II, Kecamatan Gedung Surian, Kabupaten Lampung Barat, Prov. Lampung.

D. Variabel Penelitian

Propionicacterium acnes merupakan bakteri gram positif berbentuk batang dan merupakan flora normal kulit yang ikut berperan dalam pembentukan jerawat (Hafsari *et al.*, 2015).

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini ialah konsentrasi ekstrak 1%, 2% dan 3% daun sirih (*Piper betle* L.) dalam formula bedak tabur pada pengujian bakteri *Propionibacterium acnes*.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi akibat dari adanya variabel bebas meliputi uji organoleptis, homogenitas, derajat halus dan diameter zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol adalah variabel/faktor lain yang ikut berperan dan sengaja dikendalikan yaitu:

- a. Pada sterilisasi alat dan bahan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dan oven dengan suhu 160-180°C selama 2 jam.

- b. Pada pemekatan ekstrak daun sirih menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* dengan suhu 30-50°C.
- c. Pada pembuatan sediaan bedak tabur terdapat uji Organoleptis, homogenitas dan derajat halus yang harus sesuai dengan literatur.

E. Pengumpulan Data

1. Alat penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nampan, batang pengaduk, *blender* (Maspion), penjepit kayu, lampu spiritus, pipet tetes, neraca analitik (ohauss), spatula, kaca arloji, kertas perkamen, beaker glass (pyrex), gelas ukur (pyrex), tabung reaksi (pyrex), batang pengaduk, corong kaca (pyrex), kertas saring, cawan porselen (pyrex), *rotary evaporator* (biobase), *waterbath* (DHH-88), mortir dan stemper, pengayak no 100, sudip, wadah bedak tabur, kaca pembesar, jangka sorong (Mitutoyo) dan Erlenmeyer (pyrex).

2. Bahan Penelitian

Zat aktif yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun sirih hijau (*Piper betle* L.), pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% (femmypermana), dan eksipien yang digunakan antara lain: zink oksida (cvmedankimia), mentol (pharmapreneurstore), metil paraben (planet kimia), Ol.Piper betle (javaplants), talcum (pharmapreneurstore), kapas steril, alumunium foil, media nutrien agar (pharmapreneurstore), bakteri *Propionibacterium acnes*, pereaksi mayer, wagner, dragendrof, serbuk Mg, larutan HCl dan larutan FeCl₃.

F. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Simplisia

Siapkan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang masih segar sebanyak 2 kg yang diperoleh dari Desa Bungin II, Kecamatan Gedung Surian, Kabupaten Lampung Barat. Setelah itu, dilakukan sortasi basah lalu dilakukan pencucian daun sirih dengan cara dicuci bersih dengan air mengalir. Setelah dilakukan pencucian, simplisia dilakukan perajangan lalu simplisia dikeringkan dengan cara pengeringan secara tidak langsung (Simplisia ditutupi dengan kain hitam) di bawah sinar matahari hingga mengering. Lalu, dilakukan sortasi kering dengan cara memilih daun sirih yang sudah kering dari yang rusak atau terkena kotoran. Setelah dikeringkan simplisia diperhalus dengan cara menumbuk atau menggunakan *blender* (Maspion) menjadi partikel-partikel yang lebih kecil lagi, kemudian ayak (mesh 40) lalu masukan ke dalam wadah yang kering.

2. Ekstraksi

Disiapkan wadah berupa toples kaca yang digunakan untuk proses maserasi, setelah itu serbuk daun sirih hijau ditimbang sebanyak 500 mg kemudian dimasukan ke dalam wadah toples kaca dan ditutupi dengan kain hitam lalu dimasukan 3000 mL etanol 96% sebagai pelarut, lalu wadah toples kaca ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* dan diletakkan pada tempat yang terhindar dari cahaya matahari selama 3 x 24 jam pada suhu ruangan, sesekali diaduk dan diulang beberapa kali. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring sehingga

di peroleh filtrat. Rendam kembali ampas tersebut dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 2000 mL, aduk dan tutup dengan alumunium foil, diamkan lagi selama 2x24 jam dan diaduk secara berkala. Setelah itu saring kembali hasil remaserasi, filtrat hasil pertama dan kedua dicampurkan lalu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak untuk mendapatkan ekstrak kental pada suhu 30-50°C. Setelah itu ekstrak kental yang didapat dikentalkan lagi menggunakan *waterbath* untuk memperoleh ekstrak yang lebih kental.

3. Uji Kadar Air Ekstrak

Pengukuran kadar air dilakukan dengan menggunakan metode pengeringan dengan cara cawan porselin dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 1 jam kemudian di timbang cawan porselen yang kosong setelah itu ditimbang ekstrak sebanyak 2 gram dan dimasukan kedalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Kemudian sampel didinginkan di dalam desikator selama 20 menit dan ditimbang bobotnya (Azizah & Salamah, 2013).

4. Skrining fitokimia

a. Flavonoid

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,5 mg, lalu ditambahkan HCl pekat 3 tetes, warna kuning kecoklatan, hijau, hitam dan orange menunjukkan positif flavonoid (Kursia *et al.*, 2016).

b. Uji saponin

Ekstrak sebanyak 0,1 g dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 mL air hangat atau panas lalu dikocok selama 30 menit. Dilihat busanya dan diukur berapa cm busa yang terbentuk. Dibiarkan selama 5 menit dan jika busanya tidak hilang ditambahkan HCl 2 N. Apabila masih terdapat busa yang konstan maka menunjukkan hasil yang positif (Kursia *et al.*, 2016).

c. Uji Alkaloid

Ekstrak sebanyak 0,1 g dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 2 mL kloroform dan 2 ml ammonia, dikocok kemudian ditambahkan HCl 2N. Larutan yang diperoleh dibagi menjadi 3 bagian dalam tabung reaksi dimana masing-masing tabung reaksi ditambahkan pereaksi Dragendorf, pereaksi Mayer dan pereaksi Wagner. Pereaksi Dragendorf endapan merah/jingga menunjukkan positif senyawa alkaloid, pada pereaksi mayer endapan putih menunjukkan positif senyawa alkaloid dan pada pereaksi wagner endapan coklat menunjukan hasil yang positif (Kursia *et al.*, 2016).

d. Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan menggunakan larutan FeCl₃ ditimbang sampel sebanyak 0,5 gram, selanjutnya dilarutkan dengan menggunakan pelarut aquadest yang telah dipanaskan sebelumnya. Larutan tersebut kemudian dipanaskan selama 15 menit dan

selanjutnya disaring menggunakan kertas saring. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukkan 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 (Kursia *et al.*, 2016).

5. Formula

Formulas sediaan bedak tabur ekstrak daun sirih dapat dilihat pada tabel 3.1 (Nisa *et al.*, 2020).

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Bedak Tabur Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

Komponen	Formula (%)			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak Daun sirih	-	1	2	3
Zink Okside	10	10	10	10
Mentol	1	1	1	1
Methyl Paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Ol. Piper betle	q.s	q.s	q.s	q.s
Talkum	10	10	10	10

Keterangan:

Formula F0 : Formula tanpa ekstrak daun sirih

Formula F1 : Formula dengan konsentrasi ekstrak daun Sirih 1%

Formula F2 : Formula dengan konsentrasi ekstrak daun Sirih 2%

Formula F3 : Formula dengan konsentrasi ekstrak daun Sirih 3%

6. Pembuatan Bedak Tabur

Disiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan. Zink oksida diayak terlebih dahulu menggunakan mesh 60 agar tidak terjadi penggumpalan pada sediaan. Ditimbang masing-masing bahan sesuai formulasi. Siapkan mortir 1, masukkan zink oksida yang telah diayak, mentol dan metil paraben yang telah dilarutkan dengan etanol dan sebagian talkum ke dalam mortir kemudian digerus hingga homogen

(massa 1). Pada mortir yang lain, dimasukkan ekstrak daun sirih kemudian dikeringkan dengan sisa talkum sedikit demi sedikit gerus hingga homogen (massa 2). Lalu dimasukkan massa 1 ke dalam massa 2 sedikit demi sedikit, kemudian digerus sampai homogen dan ditetesi oleum *piper betle* 1-2 tetes dan digerus hingga homogen. Setelah dicampur, bedak dimasukan ke dalam wadah bedak dan dilakukan evaluasi bedak tabur.

7. Evaluasi Sediaan bedak tabur

a. Uji Organoleptis

Pengujian ini dilakukan untuk melihat secara visual penampilan fisik dari sediaan yang dibuat. Pengujian organoleptis dilakukan dengan mengamati sediaan dari tekstur, warna dan bau sediaan menggunakan pancaindra (Nisa *et al.*, 2020).

b. Uji Homogenitas

Dispersi warna diuji dengan cara meyebarkan sediaan bedak tabur sebanyak 1gram pada permukaan kertas berwarna putih dan dilihat menggunakan alat kaca pembesar. Tidak boleh ditemukan adanya lapisan warna atau ketidaksempurnaan pada disperse bedak tabur yang menyebabkan pulverasi (penyerbukan) yang tidak merata (Nisa *et al.*, 2020).

c. Uji Derajat Halus

Seluruh serbuk diayak dengan menggunakan ayakan nomor 100 *mesh*. Kemudian data dimasukkan kedalam tabel dengan memberi kode 1= melewati pengayak dan 2= tidak melewati pengayak. Pada

umumnya serbuk tabur harus melewati ayakan dengan *mesh* 100 agar tidak menimbulkan iritasi pada bagian yang peka (Nisa *et al.*, 2020).

8. Uji aktivitas antibakteri bedak tabur ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.)

a. Sterilisasi Alat

Langkah pertama yang dilakukan yaitu mencuci terlebih dahulu alat yang akan digunakan kemudian dikeringkan. Lalu alat non gelas disterilkan menggunakan autoklaf dalam waktu 15 menit dengan suhu 121°C. Kemudian untuk alat-alat gelas dibungkus menggunakan kertas HVS. Kemudian disterilkan menggunakan oven selama 2 jam pada suhu 160-180°C (Handayani *et al.*, 2017)

b. Pembuatan media NA

Pembuatan media nutrient agar (merck) dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 2.8 gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest menggunakan Erlenmeyer dipanaskan menggunakan *hot plate*. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C 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 agar mikroorganisme akan tersebar lebih luas untuk berkembang biak dan mikroorganisme yang didapat akan lebih banyak

dan tersebar merata mengikuti goresan. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Farida *et al.*, 2021).

d. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara diambil sebanyak 1 ose bakteri *Propionibacterium acnes* dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9%, dengan biakan murni didalam tabung reaksi dan dikocok sampai homogen, kemudian disamakan dengan standar kekeruhan larutan *Mc.Farland* (Hafsari *et al.*, 2015). Kekeruhan dari larutan standar 0,5 *Mc.Farland* sebanding dengan jumlah koloni sel sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Aviany & Pujiyanto, 2020).

e. Uji Antibakteri

Disiapkan kertas cakram untuk F1, F2, F3, K- dan K+. Kontrol positif berupa antibiotik doksisisiklin dan kontrol negatif berupa sediaan bedak tabur tanpa ekstrak daun sirih. Ditimbang masing-masing formula F1, F2, F3 dan K- sediaan bedak tabur sebanyak 0,1gram dan dilarutkan dengan 2 mL aquadest. Setelah itu lakukan perendaman kertas cakram pada masing-masing sediaan. Setelah kertas cakram direndam kedalam sediaan lalu pindahkan ke cawan petri steril dan diamkan selama kurang lebih 30 menit. Setelah itu, disiapkan 3 cawan petri (bagi menjadi 5 bagian: F1, F2, F3, K- dan K+). Proses penanaman bakteri menggunakan metode tuang dengan cara dilakukan proses memipet suspensi bakteri sebanyak 1 mL dan digoyang-

goyangkan cawan petri searah jarum jam untuk menghasilkan bakteri tersebar merata pada cawan petri. Setelah itu sebanyak 15 mL media NA dituang ke dalam cawan petri dan homogenkan serta dibiarkan memadat. Kertas cakram yang telah direndam ditempelkan di atas media yang telah memadat. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali setelah itu cawan petri ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dengan posisi tutup cawan terbalik (Niswah, 2014).

f. Pengukuran Diameter zona hambat

Pengukuran pada diameter zona hambat dilakukan sebanyak 2 kali dengan mengukur zona bening yang terbentuk. Pada saat pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong untuk mengetahui seberapa luas diameter zona hambat yang dihasilkan (Niswah, 2014).

F. Analisis Data

Teknik analisis data dalam penelitian menggunakan analisa univariat yaitu analisis yang dilakukan terhadap tiap variabel dari hasil penelitian. Pada umumnya analisa ini hanya menghasilkan distribusi seperti jumlah panelis yang memilih persentase dari tiap variabel organoleptis, homogenitas dan derajat halus yang didapat dan telah diketahui jumlah distribusinya. Uji aktivitas antibakteri formulasi bedak tabur ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) data yang di peroleh dengan menggunakan metode difusi cakram yaitu besarnya diameter zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.