

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratorium. Daun sirih hijau (*Piper betle L*) di ekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol 96%. Gel ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*) menentukan aktivitas sediaan gel ekstrak daun sirih sebagai kandidat anti acne. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi cakram, dimana dalam teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri kemudian dimasukan kertas cakram dalam media dan diisi dengan senyawa uji.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Lokasi Penelitian
 - a. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo .
 - b. Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Diponegoro (UNDIP) untuk mengetahui kebenaran daun sirih hijau (*Piper betle L*).

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2019.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini

adalah gel yang mengandung ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*) dengan kombinasi emulgator dengan perbandingan Na-CMC dan Karbopol sebagai berikut 1%, 2%, 3%.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah uji daya lekat, uji daya sebar dan uji viskositas dari sifat fisik gel.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah alat, bahan, suhu, pencampuran bahan dan kondisi laboratorium.

D. Prosedur Pembuatan

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Diponegoro (UNDIP). Untuk mengetahui kebenaran tumbuhan daun sirih hijau (*Piper betle L*).

2. Penyiapan Bahan Baku

Daun sirih hijau (*Piper betle L*) diperoleh dari daerah Ungaran. Daun dipetik dalam kondisi segar, berwarna hijau dan belum terdapat bagian yang kering. Setelah dipanen daun dicuci dengan air mengalir sampai bersih kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung dengan cara ditutup dengan kain hitam. Setelah kering daun dibuat serbuk dengan cara diblender sampai halus dan diayak menggunakan ayakan no. 30 mesh agar memperoleh serbuk yang lebih halus.

3. Pembuatan Ekstrak Daun Daun Sirih Hijau (*Piper betle L*)

Pembuatan ekstrak daun sirih hijau (*Piperbetle L*), yaitu menggunakan metode maserasi:

- a. Ditimbang 450 g serbuk dimasukkan dalam panci kemudian dicampur dengan pelarut etanol 96% sebanyak 3375 ml. Maserasi dilakukan selama 5 hari dalam ruangan yang terlindung dari cahaya matahari dan sering dilakukan pengadukan.
- b. Maserat yang diperoleh disaring dengan menggunakan kain flanel kemudian maserat ditampung pada wadah.
- c. Ampas diremaserasi dengan pelarut etanol sebanyak 1125 ml, selama 2 hari kemudian disaring kembali menggunakan kain flanel dan didapatkan maserat II.
- d. Maserat I dan II dicampur dan diuapkan dengan menggunakan *water bath* pada temperatur 70°C hingga diperoleh ekstrak kental daun sirih hijau (*Piper betle L*).

4. Purifikasi Ekstrak

Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle L*). Pada penelitian ini pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi dengan etanol 96% selama 5 hari dan remaserasi selama 2 hari. Hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan menggunakan vakum rotary evaporator pada suhu 70°C. Kemudian dipekatkan lagi diatas waterbath. Ekstrak kental daun sirih hijau dilarutkan menggunakan etanol sebanyak 100 ml dan dipurifikasi dengan pelarut n-heksan (1:1), selanjutnya digojok

menggunakan corong pisah hingga terbentuk 2 fase dan diambil bagian etanol. Purifikasi dilakukan hingga pelarut n-heksan bening kira-kira 3-5 kali pengulangan. Kemudian dipekatkan menggunakan waterbath.

5. Identifikasi senyawa metabolit sekunder

a. Uji flavonoid

Sampel diambil 0,1 gram ditambahkan metanol sampai terendam lalu panaskan hasil fitratnya ditambahkan H_2SO_4 . Reaksinya positif ditandai dengan adanya perubahan warna dari kuning kehijauan menjadi warna merah (Harborne, 1987).

b. Uji saponin

- 1) Uji fitokimia saponin dilakukan dengan cara sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambah aquades di didihkan selama 2-3 menit, dinginkan setelah dingin dikocok dengan kuat. Uji positif ditandai dengan adanya busa yang stabil 2-3 cm selama 5 hari
- 2) Sampel sebanyak 0,05 mg dilarutkan kedalam 20 ml air panas. Kocok dengan kuat, tambahkan satu tetes HCl 2N. Sampel dinyatakan positif jika busa terbentuk selama 30 menit setelah penetesan HCl 2N.

6. Formulasediaan gel ekstrak daun sirih (*Piper betle L*)

Tabel 3.1 Formula sediaan gel ekstrak daun sirih (*Piper betle L*)

Bahan	Formula I	Formula II	Formula III	Kontrol (-)
Ekstrak daun sirih (%)	1	2	3	-
Na-CMC	5 g	5 g	5 g	5 g
Karbopol 934 (g)	1 g	1 g	1 g	1 g
TEA (g)	2 g	2 g	2 g	2 g
Gliseril (g)	10 g	10 g	10 g	10 g
Propilenglikol (g)	15 g	15 g	15 g	15 g
Propilparaben (g)	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Aquadest ad (ml)	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

7. Pembuatan Formula

Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*) dilarutkan dalam sebagian air yang telah dipanaskan di penangas air, ditambahkan Na-CMC diaduk sampai homogen, ditambahkan karbopol yang sudah didiamkan selama satu malam, lalu ditambah gliserin, propilenglikol, propilparaben, TEA dan Aquadest diaduk sampai terbentuk gel yang homogen dan dikemas dalam wadah gel (Istiana, 2016).

8. Evaluasi Sediaan Gel

Evaluasi sediaan gel akan dilakukan uji sebagai berikut:

a. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk melihat apakah sediaan yang telah dibuat homogen atau tidak. Cara uji homogenitas dengan dioleskan sediaan gel di atas plat kaca, diraba dan saat digosokkan massa gel harus menunjukkan susunan homogen yaitu tidak terasa adanya bahan padat pada kaca (Voight, 1995). Perlakuan uji

homogenitas diulang sebanyak tiga kali. Pemeriksaan homogenitas dilakukan pada hari ke 0, 7, dan 14 (Depkes RI, 1995)

b. Uji pH

Pengukuran pH dilakukan menggunakan indikator pH universal yang dicelupkan ke dalam sediaan gel, didiamkan beberapa detik kemudian dicatat pH yang terukur pH menunjukkan derajat keasaman suatu bahan, nilai pH idealnya sama dengan pH kulit atau tempat pemakaian. Hal ini bertujuan untuk menghindari iritasi. pH normal kulit berkisar antara 4-6 (Draelos dan Lauren, 2006). Pengukuran pH diulang sebanyak tiga kali. Pengukuran pH dilakukan pada hari ke 0, 7 dan 14 (Depkes RI, 1995)

c. Uji daya sebar

Uji daya sebar dilakukan untuk menjamin pemerataan gel saat di aplikasi kan pada kulit. Gel sebanyak 0,5 gram di letakkan di tengah kaca bulat, di atas gel di letak kan kaca bulat lain dan pemberat 50-150 gram diletakkan di atas kaca bulat, didiamkan selama 1 menit, kemudian diukur diameter penyebaran gel. Daya sebar yang baik berkisar pada diameter 5-7 cm (Garg *et al*, 2002). Perlakuan uji daya sebar di ulang sebanyak tiga kali.

d. Uji Daya Lekat

Gel di letakan di dalem objek gelas yang lain di letakan di atas nya dan di tekan dengan beban seberat 1 kg selama 5 menit. Objek gelas di pasang pada alat uji. Beban seberat 80 g di lepaskan dan di

catat waktunya sehingga kedua objek gelas tersebut terlepas (Oetary, 1987). Daya lekat sediaan semi padat sebaiknya lebih dari 1 detik (Zats, 1996).

e. Uji Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan alat Viskometer *Brookfield* menggunakan spindel no 2 dengan cara menuangkan sediaan gel ke dalam gelas viskometer dan nilai viskositas diketahui dengan membaca angka pada skala yang sesuai. Pengukuran viskositas dilakukan dengan menempatkan sampel dalam viskometer hingga spindel terendam. Spindel di atur dengan kecepatan 50 rpm. (Sinko, 2011).

f. Uji organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan diamati bentuk, bau, warna, konsistensi selama penyimpanan. Pengamatan organoleptis memiliki beberapa persyaratan yaitu: memiliki warna seperti zat aktif, memiliki aroma khas daun sirih, penampilan kental (Priawanto, 2017).

g. Uji Sineresis

Gel diletakkan dalam pot salep untuk menampung air yang dibebaskan dari dalam gel selama penyimpanan. Sineresis gel dihitung dengan menghitung kehilangan berat selama penyimpanan lalu dibandingkan dengan berat awal gel (Kuncari *et al.*, 2014). Sineresis yang terjadi selama penyimpanan diamati dengan menyimpan gel pada suhu ruangan selama 28 hari. Masing-masing gel ditempatkan

pada cawan untuk menampung air yang dibebaskan dari dalam gel selama penyimpanan. Sineresis dihitung dengan mengukur kehilangan berat selama penyimpanan lalu dibandingkan dengan berat awal gel (Latimer,2012).

$$\text{Sineresis gel} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A : berat awal gel (gram)

B : berat akhir gel selama penyimpanan (gram)

9. Sterilisasi alat

Sterilisasi adalah suatu proses untuk membunuh semua jasad renik yang ada, jika ditumbuhkan di alam suatu medium tidak ada jasad renik yang dapat berkembang biak. Sterilisasi harus dapat membunuh renik yang paling tahan panas yaitu spora bakteri. Adanya pertumbuhan mikroorganisme menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri masih berlangsung dan tidak sempurnanya proses sterilisasi. Jika sterilisasi berlangsung sempurna, maka spora bakteri yang merupakan bentuk paling resisten dari kehidupan mikrobial akan diluluhkan (Lay, 1992).

Sterilisasi alat dilakukan dengan 2 cara yaitu sterilisasi panas kering untuk alat-alat berupa kaca dan sterilisasi panas basah. Sterilisasi panas kering dengan oven pada suhu 170°C selama 2 jam untuk alat-alat kaca, sedangkan sterilisasi panas basah dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk alat-alat plastik dan media. Alat-alat lain seperti jarum ose

disterilisasi dengan cara dipanaskan di atas api lampu spiritus sebelum digunakan (Sari, 2013).

10. Pembuatan Medium Nutrient Agar

Nutrient agar ditimbang sebanyak 10 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, ditambahkan dengan 500 ml aquadest, lalu dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih selama 10-15 menit sambil diaduk sampai homogen (Suriawiria, 2005).

11. Uji Aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne*.

a. Uji Aktivitas antibakteri

Dilakukan menggunakan metode difusi cakram yaitu dengan menanam sediaan gel dalam media agar yang telah diberi bakteri *Propionibacterium acne*. Pemiakan bakteri diambil 1-2 ose dan disuspensikan kedalam 5mL NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 McFarland atau sebanding dengan jumlah bakteri 10^8 (CFU)/ml. Suspensi bakteri diteteskan sebanyak 50 μ L kemudian diratakan pada media dan didiamkan selama 30 menit (Winarni, 2013). Diameter zona hambat yang terbentuk diukur dengan penggaris.

Kertas cakram ditetesi sediaan gel ekstrak daun sirih sebanyak 50 μ L. Kemudian kertas cakram diletakkan diatas media dan ditekan dengan menggunakan pipet supaya menempel sempurna. Pengulangan ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Setelah selesai diberi label, lalu diinkubasi secara terbalik selama 24 jam dengan

suhu 37°C. Hasil inkubasi berupa daerah bening di sekitar cakram menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri diinterpretasikan sebagai zona hambat (Brooks *et al.*, 2013).

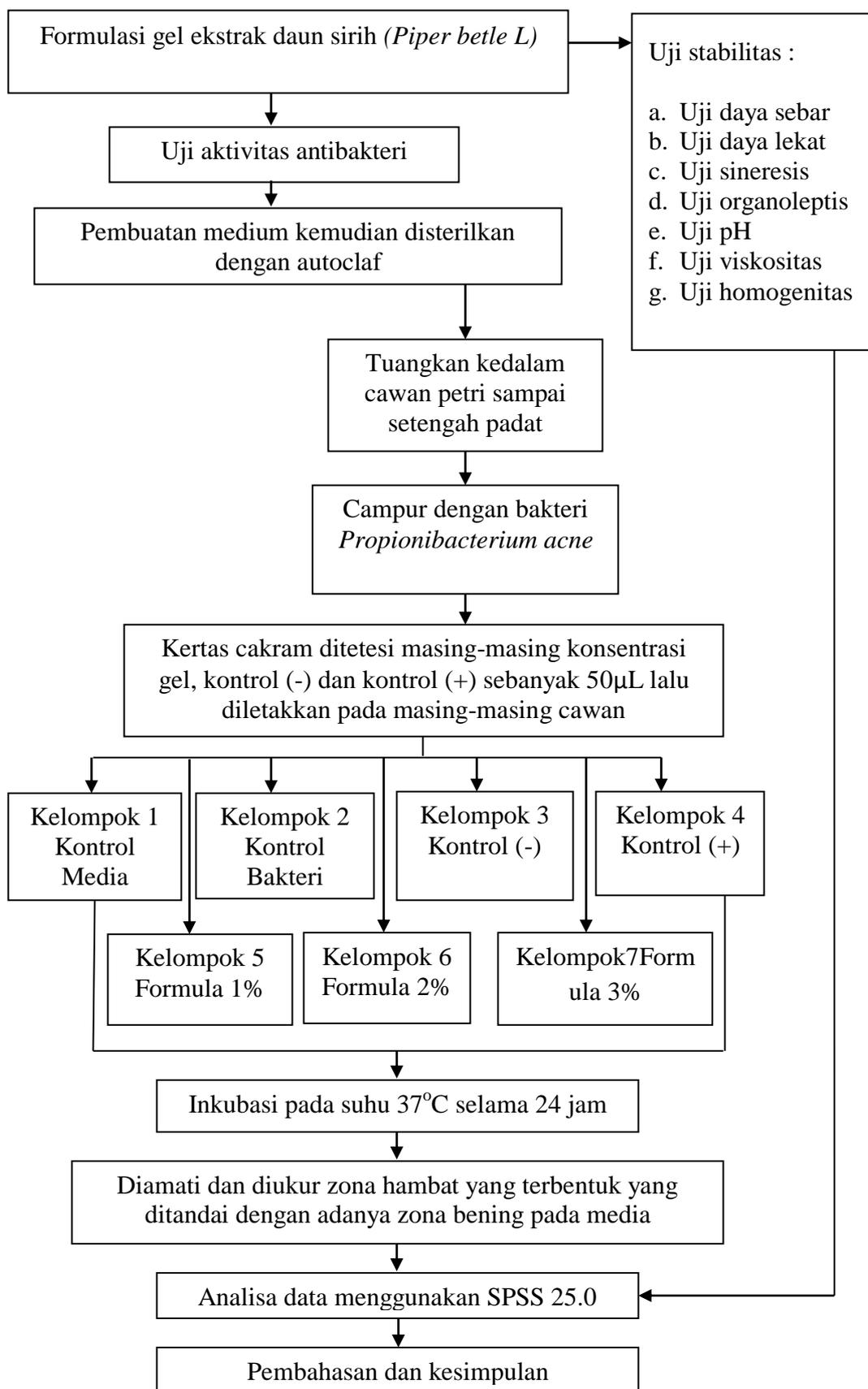
b. Pengukuran daya hambat

Zona hambat yang terbentuk pada jam ke-24 diukur menggunakan jangka sorong dan diinterpretasikan kekuatan zona hambatnya. Adanya aktivitas penghambatan terhadap *Propionibacterium acne* yang ditandai terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram yang mengandung larutan uji dan kontrol positif. Pengulangan ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

c. Kelompok perlakuan

- 1) Kelompok I: Cawan petri berisi media NA sebagai kontrol media.
- 2) Kelompok II: Cawan petri berisi media NA dan bakteri *Propionibacterium acne* sebagai kontrol pertumbuhan bakteri.
- 3) Kelompok III: Cawan petri berisi media NA dan bakteri *Propionibacterium acne* terhadap basis formula gel sebagai kontrol negatif.
- 4) Kelompok IV: Cawan petri berisi media NA dan bakteri *Propionibacterium acne* terhadap *Clindamycin* gel sebagai kontrol positif.
- 5) Kelompok V: Cawan petri berisi media NA dan bakteri *Propionibacterium acne* terhadap formulasi gel ekstrak daun sirih (*Piper betle L*) dengan konsentrasi 1%.

- 6) Kelompok VI: Cawan petri berisi media NA dan bakteri *Propionibacterium acne* terhadap formulasi gel ekstrak daun sirih (*Piper betle L*) dengan konsentrasi 2%.
- 7) Kelompok VII: Cawan petri berisi media NA dan bakteri *Propionibacterium acne* terhadap formulasi gel ekstrak daun sirih (*Piper betle L*) dengan konsentrasi 3%.



Gambar 3.1 Skema kerja penelitian

E. Analisa Data

Dalam penelitian ini dilakukan analisis deskriptif melalui uji daya sebar, uji daya lekat, uji stabilitas fisik, uji organoleptis, uji pH, uji viskositas, uji sineresis uji homogenitas. Uji aktivitas antibakteri formulasi gel ekstrak daun sirih data yang diperoleh dengan menggunakan metode difusi cakram yaitu besarnya diameter zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acne* berupa zona bening pada media.

Analisis data diameter zona hambat dilakukan dengan perangkat lunak SPSS 25.0. Untuk mengetahui normalitas data menggunakan uji Shapiro-wilk karena jumlah sampel kecil (<50). Data dikatakan terdistribusi normal jika $p > 0,05$ dan data dikatakan tidak terdistribusi normal jika $p < 0,05$. Kemudian dilanjutkan dengan uji Levene's test 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 varietasnya homogen dianalisis menggunakan uji statistik One Way Anova (Analysis Of Varians) dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang tidak memenuhi syarat tersebut maka dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji LSD (Least Significant Different).