

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental. Penelitian ini merupakan penelitian dengan rancangan *true eksperiment* dengan desain *post test control only group* karena tidak dilakukannya *pretest* terhadap sampel sebelum perlakuan. Rancangan eksperimen dalam penelitian ini adalah dengan dengan pembuatan kontrol negatif dan kontrol positif pada perlakuan uji bakteri *S. aureus*. Dengan formulasi sediaan Uji Antibakteri Formula Optimum Gel Ekstrak Etanol 95% Daun Sirsak (*A. muricata* L.) Terhadap Bakteri *S. aureus*.

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah formula optimum gel ekstrak etanol 95% daun sirsak (*A. muricata* L.).

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakteristik sediaan dan hasil uji daya hambat pertumbuhan *S. aureus* pada uji aktivitas antibakteri.

3.3. Sampel

Dalam penelitian ini terdapat tiga perlakuan (Formula optimum, kontrol positif, dan kontrol negatif) sampel dihitung menggunakan

Rumus Federer :

$$\begin{aligned}(t - 1) (r - 1) &\geq 15 \\ (3 - 1) (r - 1) &\geq 15 \\ 2 (r - 1) &\geq 15 \\ 2 r - 2 &\geq 15 \\ r &\geq 15 + 2 \\ 17 &= 8,5 = 9\end{aligned}$$

Keterangan :

r = Replikasi

t = Jumlah perlakuan

Tabel 2. Model eksperimen perlakuan

No	K (+)	K (-)	Gel Ekstrak
1	(K+).1	(K-).1	GS.1
2	(K+).2	(K-).2	GS.2
3	(K+).3	(K-).3	GS.3
4	(K+).4	(K-).4	GS.4
5	(K+).5	(K-).5	GS.5
6	(K+).6	(K-).6	GS.6
7	(K+).7	(K-).7	GS.7
8	(K+).8	(K-).8	GS.8
9	(K+).9	(K-).9	GS.9

Keterangan :

(K+) = Kontrol Positif Benzoil peroksida

(K-) = Kontrol Negative Basis Gel

GS = Gel Optimum daun Sirsak

3.4. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Teknologi dan Laboratorium Mikrobiologi STIKES Borneo Lestari Banjarbaru dan waktu penelitian dari bulan Maret-Mei 2022.

3.5. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah Alat-alat gelas standar laboratorium *autoclaf*, batang pengaduk, blender (National[®]), beaker gelas (Iwaki[®]), botol, baskom, cawan porselen, *hot plate*, kertas saring, kaca arloji, mortir stamper, pipet tetes, pH meter (ATC[®]), sendok tanduk, sudip, *Laminar air flow* (LAF), *Rotary evaporator* (IKRF10[®]), tabung reaksi (Iwaki[®]), timbangan analitik (*Scount Pro*[®]), Viskometer (NDJ-5S[®]) dan *Waterbath* (Mettler[®]).

3.6. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan sebagai zat aktif adalah daun sirsak (*A. muricata* L.) yang diambil di daerah Desa Tambak Baru Kecamatan Martapura Kabupaten Banjar. Sedangkan bahan tambahan yang digunakan yaitu carbopol 940, etanol 95%, FeCl₃, propilenglikol 5%, aquades, mayer, Mg, NaCl, H₂SO₄, HCl, Nutrien agar, TEA, Metil paraben, Reagen *Dragendroff* dan Bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1 Determinasi

Daun sirsak yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daerah desa Tambak Baru Kecamatan Martapura Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan. Tanaman utuh yang diperoleh akan dijadikan sampel untuk di determinasi. Determinasi dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.

3.7.2 Pembuatan Simplisia Daun Sirsak (*A. muricata* L.)

Daun sirsak yang sudah dikumpulkan, dilakukan sortasi basah, kemudian dicuci bersih dengan air mengalir dan bersih. Setelah dicuci simplisia daun sirsak dirajang agar proses pengeringan cepat dan merata. Kemudian dilakukan penjemuran simplisia daun sirsak dengan ditutup kain hitam tujuannya adalah agar dapat menyerap panas sehingga daun kering secara merata, metode penjemuran dilakukan secara langsung menggunakan panas dari sinar matahari yang dilakukan pada pagi hari. Simplisia daun sirsak yang telah kering dilakukan sortasi kering, ditimbang, kemudian hasil simplisia dihaluskan menggunakan *blender* dan diayak dengan ayakan *mesh* 40 lalu disimpan kedalam wadah yang tertutup baik dan rapat (Laila, 2019).

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak (*A. muricata* L.)

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 500 gram serbuk simplisia, dimasukkan ke dalam wadah kaca (maserator) dan ditambahkan pelarut etanol 95% (1:10). Dilakukan pengadukan lalu didiamkan selama 24 jam. Setelah 24 jam dilakukan penyaringan, maserat ditampung dalam wadah dan ampas dilakukan remaserasi sebanyak 3 kali. Maserat dijadikan satu kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 50⁰ C sehingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendemen ekstrak (Putri *et al.*, 2019).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot serbuk kering}} \times 100\%$$

3.7.4 Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Dilakukan dengan terlebih dahulu melarutkan 0,5 gr ekstrak etanol daun sirsak ke dalam pelarutnya yaitu etanol 95%. Selanjutnya sebanyak 2 ml larutan tersebut di uapkan menggunakan cawan porselen diatas *hotplate* Residu dilarutkan dengan 3 ml HCl 2 N. Larutan yang diperoleh dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambah 3 tetes HCl 2 N, tabung kedua ditambah dengan 3 tetes pereaksi *Dragendorff*, sedangkan pereaksi yang ketiga ditambah dengan 3 tetes pereaksi *Mayer*. Terbentuknya endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid. Reaksi dengan pereaksi *Dragendorff* akan terbentuk endapan merah jingga, dengan pereaksi *Mayer* terbentuk endapan putih (Putri *et al.*, 2019).

b. Uji Flavonoid

1 gram ekstrak sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl Pekat lalu dipanaskan dengan waktu 15 menit di atas penangas air. Apabila terbentuk warna merah atau kuning berarti positif

flavonoid (flavon, kalkon dan auron) (Muthmainnah, 2017).

c. Uji Polifenol

Ekstrak sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam etanol kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1% Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau kehitaman (Putri *et al.*, 2019).

3.7.5 Formulasi Optimum

Tabel 3 : Formulasi Optimum (Putri., *et al* 2019).

Komposisi	Konsentrasi (%)
Ekstrak Etanol Daun Sirsak	10%
Carbopol 940	1,536%
Propilen Glikol	5%
TEA	2%
Metil Paraben	0,1%
<i>Aquadest</i> ad	100 ml

3.7.6 Pembuatan gel

Metode pembuatan gel menggunakan basis carbopol 940 yaitu carbopol 940 kemudian dikembangkan menggunakan air panas 20 kalinya bobot carbopol 940 sambil diaduk perlahan sampai homogen dan mengembang, tambahkan TEA dan ditambahkan propilenglikol lalu digerus hingga homogen (campuran 1). Basis gel yang sudah dibuat, dicampurkan dengan ekstrak daun sirsak lalu digerus sampai homogen (campuran 2). Metil paraben dilarutkan dengan sedikit *aquadest* dan ditambahkan pada campuran 2.

Ditambahkan *aquadest* ad 100 ml dan digerus hingga homogen, sediaan gel yang sudah dibuat kemudian dimasukkan kedalam wadah yang ditutup rapat (Putri *et al.*, 2019).

3.7.7 Evaluasi uji

a. Pengujian Organoleptik

Pengamatan dilihat secara langsung bentuk, warna, dan bau dari gel yang dibuat, catat hasil yang didapat. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Gel biasanya jernih dengan konsistensi setengah padat (Putri *et al.*, 2019).

b. Pengujian Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara sampel gel dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang cocok, amati hasil yang didapat. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Putri *et al.*, 2019).

c. Pengujian pH

Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dicelupkan ke dalam sampel gel. Setelah tercelup dengan sempurna, amati pH yang didapat. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. pH sediaan gel harus sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5–6,5 (Laila, 2019).

d. Daya Lekat

Gel sebanyak 0,25 g diletakkan diantara 2 gelas objek pada alat uji daya lekat, kemudian ditekan beban 1 kg selama 5 menit, beban diangkat dan diberi beban 80 g pada alat dan dicatat waktu pelepasan gel. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Daya lekat yang baik lebih 1 detik (Afianti & Murrukmihadi, 2015).

e. Daya sebar

Gel ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian diletakkan ditengah di atas gel diletakkan kaca bulat lain atau bahan transparan lain dan pemberat sehingga berat kaca bulat dan pemberat 150 g, didiamkan selama 1 menit, kemudian dicatat diameter penyebarannya (Laila, 2019).

Daya sebar dihitung dengan rumus :

$$m \times \frac{l}{t} \dots\dots\dots$$

Keterangan : S = Daya sebar (cm g/dtk)
 m = Beban (g)
 l = Panjang (cm)
 t = waktu (detik)

f. Viskositas

Uji viskositas menggunakan alat *viskometer stromer* dilakukan dengan cara gel dimasukkan ke dalam wadah lalu dipasang *spindle*. *Spindle* harus terendam dalam sediaan uji. Viskometer dinyalakan dan dipastikan rotor dapat berputar pada

kecepatan 60 rpm. Diamati hasil viskositas lalu dicatat. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Viskositas yang baik 3.000-50.000 cP.s (Laila, 2019).

g. Uji stabilitas dengan metode *Freeze – Thaw*

Uji stabilitas fisik dilakukan dengan metode *freeze thaw cycling*. *Freeze thaw cycling* dilakukan dengan cara sediaan disimpan pada suhu 4⁰C selama 24 jam kemudian dipindahkan ke suhu 40⁰C selama 24 jam (1 siklus). Proses ini dihitung 1 siklus. Pengujian stabilitas dilakukan selama 6 siklus (Wiguna, 2016). Pengamatan uji stabilitas fisik dilakukan selama 6 hari.

3.7.8 Pengujian Antibakteri *Staphylococcus aureus*

a. Sterilisasi Alat

Alat – alat gelas berskala dan alat yang terbuat dari plastik disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan alat alat gelas tidak berskala disterilkan di oven pada suhu 180 °C selama 2 jam (Ismail *et al.*, 2019). Alat berbahan plastik dan karet disterilkan menggunakan etanol 70%. Jarum Ose disterilkan dengan pemijaran pada api bunsen. *Laminar air flow* disterilkan dengan menyalakan lampu UV selama 2 jam, dibersihkan dari debu, disemprot dengan alcohol 70% didiamkan selama 15 menit (Widhorini dan Ranti, 2019).

b. Pembuatan Media Nutrien Agar Miring (NA)

Sebanyak 0,28 gram Nutrien Agar (NA) dilarutkan ke dalam aquades 1 ml menggunakan erlenmeyer. Selanjutnya dihomogenkan dengan stirrer dipanaskan air dan di masak mendidih sampai terlarut. Tuangkan masing masing 5 ml pada tabung reaksi steril, dan tutup dengan *aluminium oil* sterilkan media di autoklaf pada suhu 121° C. Di pertahankan selama 15 menit dan kemudian biarkan pada suhu ruang pada suhu ruang selama 30 menit hingga memadat (Ngajaw *et al.*, 2013).

c. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Sebanyak 9,5 gram MHA dimasukkan ke dalam 1 ml erlenmeyer, kemudian dipanaskan di atas hot plate. Media tersebut lalu disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit (Handayani *et al.*, 2016).

d. Peremajaan Bakteri

Bakteri diambil menggunakan jarum ose yang telah steril, Lalu di tanamkan pada media Nutrien agar miring dengan cara digores zig-zag kemudian, diinkubasi dengan inkubator selama 24 jam pada suhu 37° C (Sari, 2018).

e. Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan (Larutan Mc. Farland 0,5).

Larutan H₂SO₄ sebanyak 0,5 ml dicampurkan dengan larutan BaCl₂.2H₂O sebanyak 0,5 ml dalam erlenmeyer.

Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Handayani *et al.*, 2016).

f. Pembuatan Suspensi Bakteri

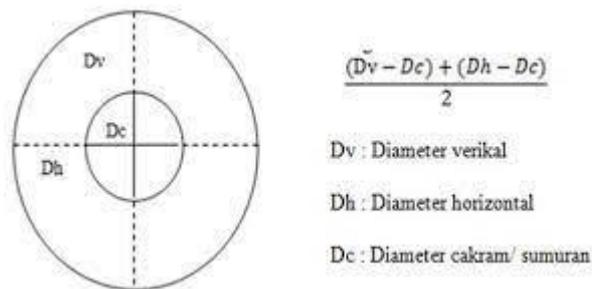
Bakteri uji yang telah diinokulasi pada media NA kemudian diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland (Handayani *et al.*, 2016).

3.7.9 Uji Aktivitas Antibakteri

Media uji difusi sumuran dibuat pengerjaannya seperti berikut :

Pipet 0,050 ml bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah diencerkan, kemudian masukkan ke dalam media MHA yang sebelumnya sudah disterilkan dalam autoclave dalam waktu 15 menit dengan suhu 121°C dan telah didinginkan dengan suhu $\pm 50^{\circ}$ -60°C. Kemudian kocok perlahan sampai bakteri tercampur sempurna dalam media. Masukkan sebanyak @ 17 ml media tersebut dalam 3 cawan petri. Diamkan sampai membeku. Setelah media padat dengan menggunakan alat bantu pencadang, letakkan pencadang logam ke dalam 2 buah cawan petri kecil yang sudah berisi media MHA dan bakteri yang sudah padat. Masukkan sampel gel daun sirsak dengan konsentrasi yang sudah ditentukan dengan

K(+) dan K(-) hasil dari pengenceran dimasukkan ke dalam masing-masing pencadangan logam sesuai dengan kode pada cawan petri sebanyak 2 – 3 tetes. Diamkan selama ± 15 menit supaya terdifusi sempurna. Inkubasikan selama 1 x 24 jam di dalam inkubator dengan suhu 37°C. Setelah 1 x 24 jam lihat dan baca hasil. Setelah itu dilihat ada tidaknya zona hambat yang terbentuk. Jika ada diukur diameter dengan cara mengukur secara horizontal dan vertical kemudian hasil yang didapat dikurangi diameter sumuran 7mm (Ngajow *et al.*, 2013).



Perhitungan diameter zona hambat Tethool (2017) :

Rumus :

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

Keterangan :

d = diameter zona hambat

A = diameter vertikal

B = diameter horisontaL

Suatu ekstrak atau tanaman perlu diketahui kekuatan antibakterinya. Menurut Davis dan Stout (1971), untuk kekuatan bakteri dapat dikelompokkan seperti pada tabel berikut:

Tabel 4. Respon Penghambatan Aktivitas Antibakteri (Glorya Sakul *et al.*, 2020)

Diameter zona hambat	Respon hambat
> 20 mm	Sangat Kuat
10 mm - 20 mm	Kuat
5 mm - 10 mm	Sedang
< 5 mm	Lemah

3.8 Analisis Data

Data hasil dapat dilihat dari diameter zona hambat. Data tersebut dianalisis menggunakan SPSS 25 untuk melihat apakah ada perbedaan dari masing-masing kelompok dari formula optimum, kontrol positif dan kontrol negatif. Ada beberapa tahap yang harus dikerjakan untuk analisis data, tahapan tersebut yaitu ;

1. Uji normalitas

Uji normalitas merupakan uji yang dilakukan sebagai prasyarat untuk melakukan analisis data. Uji normalitas dilakukan sebelum data diolah berdasarkan model-model penelitian yang diajukan. Uji normalitas data bertujuan untuk mendeteksi distribusi data dalam satu variabel yang akan digunakan dalam penelitian. Data yang baik dan layak untuk membuktikan model-model penelitian tersebut adalah data distribusi normal. Uji normalitas yang digunakan adalah uji Kolmogorov-Smirnov (Sugiyono, 2013:257). Data dikatakan normal, apabila nilai signifikan lebih besar 0,05 pada ($P > 0,05$). Sebaliknya, apabila nilai signifikan lebih kecil dari 0,05 pada ($P < 0,05$), maka dikatakan tidak normal.

2. Uji homogenitas

Uji homogenitas digunakan untuk memperlihatkan bahwa dua atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi yang sama. Uji homogenitas dikenakan pada data hasil *post-test* dari kelompok eksperimen dan kelompok control. Taraf signifikansi yang digunakan adalah $\alpha = 0,05$. Uji homogenitas menggunakan SPSS 25 dengan kriteria yang digunakan untuk mengambil kesimpulan apabila F hitung lebih besar dari F tabel maka memiliki varian yang homogeny. Akan tetapi apabila F hitung lebih besar dari F tabel, maka varian tidak homogen (Sugiyono, 2013:257).

3. Analisis Statistik

Data yang terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistik parametrik yaitu dengan analisis varian (ANOVA). Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak bervarian homogen menggunakan analisis non parametrik *Kruskal Wallis*. Analisis data menggunakan *Software SPSS 25 for Windows*.