

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol 70%, buah mahkota dewa, PVA, HPMC, gliserin, methyl paraben, propil paraben, aquadest, Klindamisin, *Staphylococcus aureus*, media Nutrien Agar (NA), dan larutan standar *McFarland* (0,5), HCl 2 N, FeCl₃ 1%, Gelatin 1%, serbuk Mg, pereaksi Mayer, Pereaksi Dragendorff, NaCl 0,09%, *paper disc* (*Oxoid*).

3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, cawan penguap, penangas air, pH meter (827 pH lab *Metrhom*), pipet tetes, spatula, kertas saring dan Viskometer (*brookfield*), autoklaf (*Gea*), inkubator (*Gemmyco*), neraca analitik (*New tech*), gelas ukur 50 ml (*Iwaki*), gelas ukur 10 ml (*Borosil*), corong, *beaker glass* 100 ml (*Borosil*), mikropipet (*Fisherbrand*), spiritus, *object glass*, mortir, stamper, cawan petri, tabung reaksi (*Pyrex*), jangka sorong, *hot plate* (*Cimarec*), *rotary evaporator* (*IKA*), *Laminar Air Flow* (LAF) (*Mascotte*), aluminium foil, dan jarum ose.

3.3 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Semi Solid Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.3.2 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan November 2021 - Juni 2022.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran bahan yang digunakan pada penelitian. Identifikasi tanaman dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Jawa Timur.

3.4.2 Ekstraksi Metanol Buah Mahkota Dewa

Buah mahkota dewa dicuci bersih, ditimbang, lalu diiris harus dan dikeringkan dengan cara didiamkan pada suhu kamar. Sampel kering diblender sampai menjadi serbuk. Kemudian serbuk tersebut diayak hingga diperoleh serbuk berukuran 40 mesh. Serbuk buah mahkota dewa dimaserasi menggunakan metanol 70% pada suhu kamar selama tiga hari. Hasil maserasi selanjutnya disaring sehingga diperoleh ekstrak cair metanol 70% tahap 1. Ampas yang telah disaring diremaserasi dengan metanol 70% pada suhu kamar selama tiga hari. Hasil maserasi selanjutnya disaring sehingga diperoleh ekstrak cair metanol 70% tahap 2. Kemudian ampas yang telah dikeringkan diremaserasi kembali dengan metanol 70%. Hasil maserasi selanjutnya disaring sehingga diperoleh ekstrak cair metanol 70% berwarna bening. Ekstrak cair yang diperoleh dilanjutkan pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator* untuk

menghilangkan pelarut. Setelah dipekatkan selanjutnya dilakukan pengentalan ekstrak menggunakan *waterbath* (Ma'ruf *et al.*, 2017).

3.4.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak metanol buah mahkota dewa dalam penelitian ini dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 2 mL ekstrak metanol buah mahkota dewa diuapkan diatas cawan porselin hingga diperoleh residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5 ml HCl 2N, dikocok kuat. Campuran tersebut dipisahkan menjadi dua bagian dalam tabung reaksi, tabung reaksi I di isi pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes, adanya endapan putih menandakan hasil positif alkaloid, tabung reaksi II di isi pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes, adanya endapan jingga menandakan hasil positif alkaloid (Farnsworth, 1966).

2. Uji Polifenol

Masukkan hasil filtrasi pemanasan yang menggunakan aquades ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan FeCl_3 3-4 tetes. Adanya warna hitam kebiruan atau hitam kehijauan menandakan hasil positif fenol (Yasir *et al.*, 2021).

3. Flavonoid

Sebanyak 2 ml ekstrak metanol buah mahkota dewa kemudian memasukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi dan menambahkan 0,5 asam klorida (HCl 5N) dan logam Mg. Kemudian dikocok kuat,

adanya warna kuning, merah menunjukkan positif flavonoid (Kurang dan Malaipada, 2021).

4. Saponin

Ekstrak metanol buah mahkota dewa sebanyak 10 mL dikocok vertical di dalam tabung reaksi selama 10 detik kemudian didiamkan selama 10 detik. Adanya Saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N busa tersebut tidak hilang (Depkes RI, 1995).

5. Tanin

Masukkan hasil pemanasan ekstrak metanol buah mahkota dewa yang menggunakan aquades ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan Gelatin 1%. Kemudian dikocok, jika terbentuknya endapan putih, menandakan hasil positif tanin (Fikayuniar, 2020).

3.4.4 Uji Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa Terhadap *Staphylococcus aureus*

Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak metanol buah mahkota dewa terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara tuangkan larutan media nutrient agar (NA) ke dalam cawan petri steril sebanyak yang dibutuhkan. Ambil suspensi bakteri secukupnya menggunakan cotton steril, homogenkan pada media NA kemudian tunggu sampai media memadat. Siapkan 8 tabung reaksi steril. Ambil ekstrak metanol buah mahkota dewa dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 1,5% ditetaskan pada kertas cakram steril dan biarkan beberapa saat agar meresap. Dan dibuat kontrol positif (klindamisin) dan kontrol negatif (aquadest). Kertas

cakram diletakan dia atas media agar yang sudah memadat dan diletakan secara teratur. Media yang telah diletakan kertas cakram diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, selanjutnya dilakukan pengamatan zona hambat yang terbentuk pada media.

3.4.5 Formulasi

Formulasi Sediaan Masker *peel-off* ekstrak metanol buah Mahkota Dewa dituliskan dalam **Tabel 3.2** dibawah ini.

Tabel 3.2 Formulasi Sediaan Masker *peel-off* Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa

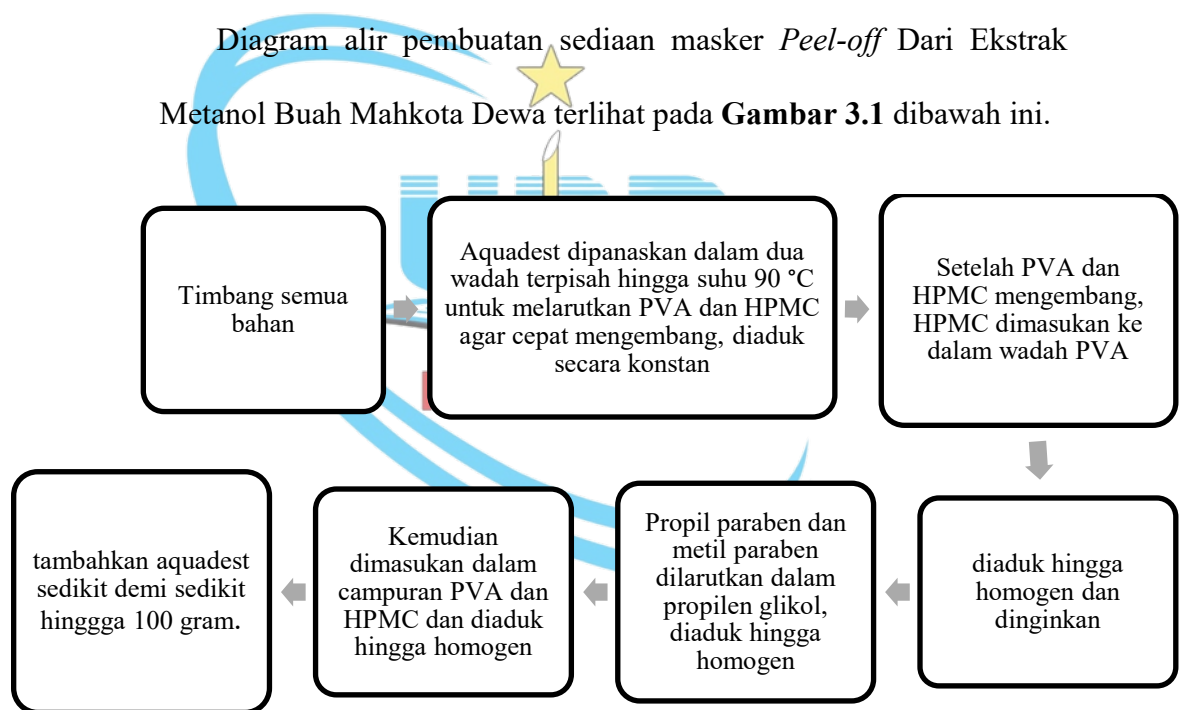
Nama Bahan	Formula (%)				Fungsi
	F0	F1	F2	F3	
Ekstrak metanol buah mahkota dewa	-	6,25	7,25	8,25	Zat Aktif
PVA	11	11	11	11	<i>Gelling agent</i>
HPMC	3	3	3	3	Agen peningkat viskositas
Propilen glikol	10	10	10	10	Humektan
Methyl paraben	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet
Propil paraben	0,05	0,05	0,05	0,05	Pengawet
Aquadest	100	100	100	100	Pelarut

3.4.6 Pembuatan Sediaan Masker *Peel-off* dari Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa

Prosedur pembuatan sediaan masker *peel-off* dari ekstrak metanol buah mahkota dewa dilakukan dengan cara bahan-bahan yang digunakan ditimbang terlebih dahulu. Aquadest dipanaskan dalam dua wadah terpisah hingga suhu 90°C untuk melarutkan PVA dan HPMC agar cepat mengembang, diaduk secara konstan. Setelah

PVA dan HPMC mengembang, HPMC dimasukan ke dalam wadah PVA. Sambil diaduk sampai homogen, kemudian didinginkan. Propil paraben dan metil paraben dilarutkan dalam propilen glikol, diaduk hingga homogen kemudian dimasukan dalam campuran PVA dan HPMC dan diaduk hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan aquadest sedikit demi sedikit hingga 100 gram. Setelah itu dikemas dalam wadah tertutup rapat (Amaliah *et al.*, 2018).

Diagram alir pembuatan sediaan masker *Peel-off* Dari Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa terlihat pada **Gambar 3.1** dibawah ini.



Gambar 3. 1 Diagram Alir Pembuatan Sediaan Masker *Peel-off*

3.4.7 Evaluasi Fisik Sediaan Masker *Peel-Off* Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa

Pada evaluasi fisik sediaan masker *peel-off* ekstrak metanol buah mahkota dewa dilakukan beberapa pengujian diantaranya sebagai berikut:

1. Uji organoleptik

Pengamatan organoleptik dilakukan dengan mengamati dari segi bau, bentuk, dan warna sediaan masker (Somantri, 2020).

2. Uji Homogenitas

Homogenitas sediaan dilakukan dengan cara mengoleskan masker pada gelas objek kemudian ditempel dengan gelas objek lainnya. Homogenitas ditunjukkan dengan ada tidaknya butiran kasar (Hidayati *et al.*, 2019).

3. Uji pH

Sediaan masker *peel-off* ekstrak metanol buah mahkota dewa diambil sebanyak 0,5 gram lalu diencerkan dengan 5 ml aquadest. Pengukuran pH masker *peel-off* dilakukan menggunakan pH meter. pH pada kulit umumnya yaitu 4,5-6,5 (Kindangen *et al.*, 2018).

4. Uji viskositas

Pengukuran viskositas menggunakan *Viskometer Lamy* dengan spindel nomor 6 pada kecepatan 100 rpm selama 1 menit dengan cara sediaan dimasukan ke dalam beaker glass sampai mencapai volume 100 mL, lalu spindle diturunkan hingga tercelup pada sediaan. Selanjutnya tekan tombol ON, kemudian diatur kecepatan spindle 100 rpm selama 1 menit, dan dibaca skalanya dimana jumlah merah yang bergerak telah stabil (Nababan, 2019). Viskositas masker *peel-off* yang baik antara 7.100-83.144 cps (Kartika *et al.*, 2020).

5. Uji daya sebar

Pada pengujian daya sebar masker *peel-off* yaitu untuk melihat kemampuan menyebar diatas permukaan kulit pada saat pemakaian. Sediaan masker ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian diletakan diantara lempeng kaca berdiameter bulat. Kemudian beri 50 g beban dan dibiarkan selama 1 menit lalu diukur diameter sebaranya. Dicatat diameter gel yang menyebar dan Penambahan beban 50 g secara terus menerus 100 g, 150 g dan 200 g (Hidayati *et al.*, 2019). Masker *peel-off* yang baik memiliki diameter daya sebar 5-7 cm (Ardini dan Rahayu, 2019).

6. Uji daya lekat

Pengujian daya lekat dilakukan untuk kempuan melekatnya masker *peel-off* pada saat diaplikasikan yaitu dengan cara meletakan sampel sediaan masker *peel-off* di atas objek glass yang telah ditentukan luasnya. Selanjutnya letakan objek glass lain diatasnya. Ditambahkan beban 50 g selama 1 menit. Beban dilepaskan hingga *object glass* terpisah. Catat waktu pelepasan dari *object glass* (Hidayati *et al.*,2019). Daya lekat pada masker *peel-off* yaitu kurang dari 7 menit 14 detik dan tidak kurang dari 4 detik (Ningrum, 2018).

7. Uji waktu pengeringan sediaan masker *peel-off*

Pengujian waktu pengeringan ini untuk mengetahui berapa lama sediaan masker *peel-off* mampu mengering. Waktu ideal

pengaplikasian masker secara umum yaitu pada rentang waktu 15-30 menit (Ardini dan Rahayu, 2019). Sediaan dioleskan secukupnya dan disebar di atas permukaan kulit dengan luas 2,5 cm hingga membentuk lapisan tipis seragam (Nababan, 2019).

3.4.4 Uji Efektivitas Antibakteri Masker *Peel-off* Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa Terhadap *Staphylococcus aureus*

Pengujian efektivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* masker *peel-off* ekstrak metanol buah mahkota dewa dilakukan beberapa tahap diantaranya sebagai berikut :

1. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Jarum ose dibakar dengan api bunsen (Kindangen *et al.*, 2018).

2. Prosedur Pembuatan Media

Diambil nutrient agar (NA) sebanyak yang dibutuhkan dilarutkan dalam 100 mL aquadest menggunakan erlenmeyer. Selanjutnya dihomogenkan di atas *hot plate* sampai mendidih. Sebanyak 10-20 ml dituangkan pada 5 cawan petri dan ditutup aluminium foil. Media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Dan didiamkan pada suhu ruangan selama 30 menit sampai media memadat (Andriani, 2017).

3. Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Menyiapkan biakan bakteri murni *Staphylococcus aureus*, memanaskan jarum ose dan menunggu beberapa saat hingga jarum ose dingin kembali, selanjutnya kultur bakteri diambil sebanyak satu ose, menginokulasikan bakteri ke dalam media padat NA pada cawan petri sebanyak 1 *plate* dan digores secara zig-zag, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Andriani, 2017).

4. Pembuatan Media Suspensi Bakteri

Ambil bakteri uji yang telah diremajakan menggunakan jarum ose steril kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% sebanyak 5 mL, kemudian suspensi bakteri disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar *McFarland* 0,5 (Haffizah *et al.*, 2015).

5. Pengujian Efektivitas Antibakteri Sediaan Masker *Peel-off* Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa

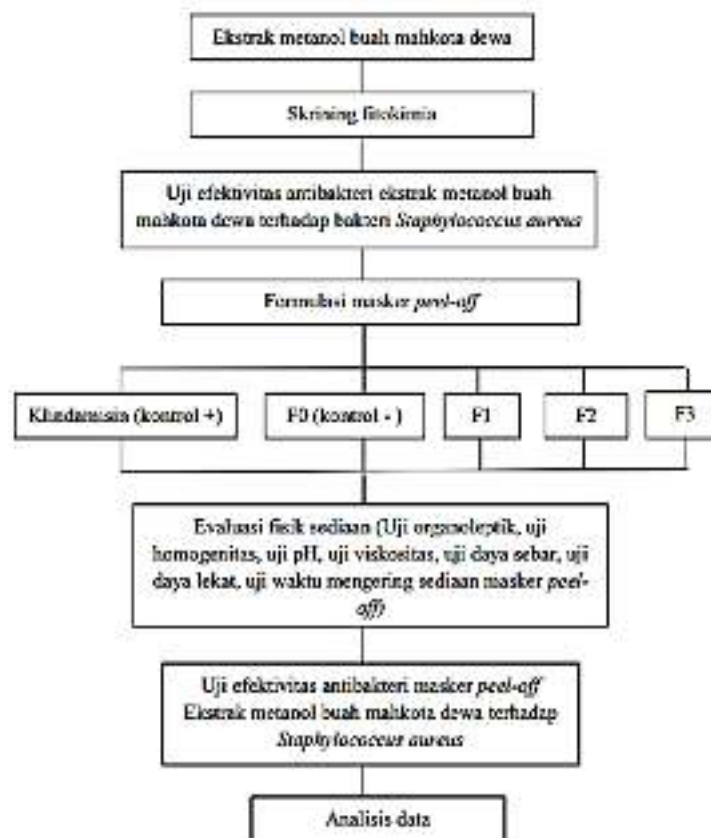
Pada pengujian antibakteri sediaan masker *peel-off* ekstrak metanol buah mahkota dewa dilakukan dengan metode difusi cakram. Siapkan petri yang berisi 20 ml media NA, ambil suspensi bakteri uji, inokulasikan ke media NA secara merata dengan cara *spread plate* dan biarkan permukaan mengering. Secara aseptik, letakan disk yang mengandung formulasi sediaan masker *peel-off* ekstrak metanol buah mahkota dewa dengan konsentrasi 6,25%, 7,25%, 8,255% dan 1 disk kontrol positif (klindamisin) serta 1 *disk* kontrol negatif (F0) pada

permukaan media NA. Setiap kertas cakram diinokulasikan dengan jarak tertentu secara teratur, supaya tidak terjadi *overlapping* zona hambat yang terbentuk. Beri label pada dasar petri secara benar. Media NA tersebut kemudian di bungkus dengan kertas sampul coklat ,kemudian inkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi dilakukan pengukuran zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram dengan penggaris atau jangka sorong (Kusumawati, 2019).



3.5 Diagram Alir Penelitian

Diagram alir penelitian dijelaskan pada **Gambar 3.2** dibawah ini.



Gambar 3. 2 Diagram Alir Alur Penelitian

3.6 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh dari hasil evaluasi fisik dan uji efektivitas antibakteri sediaan masker *peel-off* dari ekstrak metanol buah mahkota dewa diolah menggunakan SPSS versi 26. Sampel diuji *Kolmogorof-Smirnof* yang bertujuan untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak, kemudian dilanjutkan uji homogenitas yang bertujuan untuk meyakinkan bahwa data yang diambil memang berasal dari populasi yang homogen. Jika hasil Sig. $>0,05$ maka dilanjutkan uji ANOVA tetapi jika $<0,05$ dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis.

