

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian quasi eksperimental, pada penelitian ini akan dilakukan pembuatan formulasi sediaan krim dari ekstrak etanol daun mangga arumanis yang akan di uji aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes*. Pembuatan formulasi serta pengujian aktivitas antibakteri bertujuan untuk mengetahui efektivitas dari sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis (*Mangifera indica*. L) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* yaitu bakteri penyebab jerawat.

3.2 Sampel Penelitian

3.2.1 Bahan yang akan diuji

Ekstrak etanol 70% daun mangga arumanis

3.2.2 Sampel bakteri

Propionibacterium acnes

3.3 Bahan & Alat penelitian

Bahan dan alat penelitian ini mengacu pada penelitian (Dewi dkk, 2020)

3.3.1 Bahan penelitian

Ekstrak daun mangga arumanis, etanol 70%, Asam stearate, Gliserin, TEA (Trietanolamin), setil alkohol, parafin, metil paraben,

propil paraben, aquadest, gel clindamycin, bakteri *Propionibacterium acnes*, nutrient agar, Bouchardt, dragendorf, mayer.

3.3.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, wadah krim, blender, maserator, *viscotester lammy* (Lamy Rheology Instruments), oven, *laminar air flow* (LAF) (*mascode*), Anaerobic jar (BBL GasPak Anaerobic Systems), Coloni Countre, Inkubator (LAB INCUBATOR Digital # IN-601 Gemmyco), jangka sorong (Vernier Caliper), neraca gram, mortir, stemper, penangas air, pH meter (PH/ISE Meter pH-240L), timbangan analitik, jarum ose, cawan petri, mikropipet, beaker glass 100mL (Pyrex), beaker glass 250 mL (pyrex), gelas ukur 100 mL (Iwaki), cawan arloji, sudip, kertas perkamen, corong glass (pyrex), lampu spirtus, cawan porselen 50mL, batang pengaduk.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi variabel

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu 3 konsentrasi ekstrak etanol daun mangga arumanis yang dibuat sebagai krim anti jerawat untuk wajah dengan variasi konsentrasi ekstrak F1 5%; F2 10%; dan F3 15%.

2. Variabel terikat

Variabel terikat meliputi uji efektivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran serta evaluasi fisik sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis yang meliputi pengujian organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat dan stabilitas penyimpanan sediaan.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Berikut adalah definisi operasional variabel dapat dilihat pada

Tabel 3.1 dibawah ini :

Tabel 3.1 Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel bebas						
1	Formula krim ekstrak etanol daun mangga arumanis	Konsentrasi Ekstrak etanol daun mangga arumanis yang diformulasi kan dalam sediaan krim anti jerawat dari ekstrak daun	Menimbang ekstrak etanol daun mangga arumanis Menggunakan neraca analitik kemudian ditambahkan ke dalam formula	Neraca analitik	Ekstrak etanol daun mangga arumanis 5%, 10%, dan 15% Sebagai antibakteri dalam sediaan krim anti jerawat	

mangga
arumanis
sebagai
antibakteri
penyebab
bakteri
jerawat
P.acne

Variabel Terikat

1	Uji organoleptik 1) Aroma	Parameter fisik menggunakan indera penciuman dalam pengujian sampel krim ekstrak etanol daun mangga arumanis	Mencium bau dari sediaan krim anti jerawat yang telah dibuat.	Nominal	F1 5% aroma lemah F2 10% aroma kuat F3 15% aroma kuat	Nominal
	2) Warna	Parameter fisik dengan cara indra visual dalam pengujian sampel krim ekstrak etanol	Melihat warna dari sediaan krim anti jerawat yang telah dibuat.		F1 5% warna coklat muda F2 10% warna coklat tua F3 15% warna coklat tua	Nominal

	daun mangga				
	arumanis				
3) Uji homogenitas	Uji homogenitas dilakukan dengan mengoleskan sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis pada kaca objek, kemudian dikatupkan dengan kaca objek yang lainnya untuk diamati homogenitasnya	Mengoleskan 0,1 gram sediaan krim pada kaca objek lalu ditutup kembali dengan kaca objek lain.	F1 Homogen F2 Homogen F3 Homogen	5% 10% 15%	Nominal
4) Uji pH	Nilai pH pada sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis yang ditunjukkan	Melihat nilai pH krim dengan alat pH meter.	pH meter	Angka dalam pH meter	Rasio

		sesuai dengan pH kulit oleh pH meter			
5) Uji daya sebar	Penyebaran diartikan sebagai kemampuan penyebarannya pada kulit. Sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis dengan volume tertentu diletakkan dipusat lempeng kaca berdiameter bulat.	Mengoleskan 0,1 gram krim pada pusat lempeng kaca dan mengukur penyebaran krim pada lempeng kaca setelah ditambahkan beban dalam waktu 60 detik	Cm (Centimeter)	Rasio	
7	Uji viskositas	Untuk mengukur kekentalan dan laju aliran partikel	Melihat nilai Viskositas krim dengan alat viskometer	Viscometer	Nilai viskositas dalam angka Nominal

		dalam suatu sediaan			
8	Uji daya lekat	Kemampuan sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis untuk dapat melekat baik pada kulit.	Alat plat kaca yang di beri beban dan stopwatch	S (<i>second</i>)	Rasio

3.5 Lokasi penelitian & waktu penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Waktu penelitian dilakukan dari bulan Februari – Juni 2022.

3.6 Prosedur penelitian

3.6.1 Preparasi sampel

Sampel daun mangga arumanis berasal dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO), Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Daun mangga arumanis dipetik pukul 07.00, daun yang dipetik yaitu bagian daun muda, setelah dipetik daun dibersihkan, dicuci dan dikeringkan. Selanjutnya, sampel tersebut digunting kecil-kecil dan dihaluskan dengan menggunakan *blender* sampai halus sehingga membentuk serbuk.

3.6.2 Determinasi

Daun mangga arumanis yang telah terkumpul di determinasi di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Jawa Timur. Tujuan determinasi tanaman yaitu untuk mendapatkan kebenaran identitas dengan jelas dari suatu tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian. (Diniatik, 2015).

3.6.3 Ekstraksi daun mangga arumanis

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan penggunaan pelarut etanol 70%. 2000 gr serbuk simplisia daun mangga arumanis dimasukkan ke dalam maserator yang telah ditutupi oleh lakban hitam, kemudian masukkan pelarut etanol 1:10 ke dalam maserator yang telah terdapat simplisia di dalamnya sampai terendam seluruhnya. Diamkan selama 3 hari sambil sekali kali di aduk. Setelah 3 hari residu dan filtrate kemudian dipisahkan, residu di remaserasi kembali, filtratnya dikumpulkan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental setelah itu maserat kemudian diuapkan pelarutnya dengan alat *Rotary evaporator* pada suhu 55°C sampai diperoleh ekstrak etanol daun mangga arumanis yang kental (Mulangsari, 2020; Setiani, 2017).

3.6.4 Skrining fitokimia

Dilakukan skrining fitokima secara kualitatif untuk mengetahui kandungan flavanoid, tanin, saponin dan alkaloid (Ningsih dkk, 2017).

- Uji senyawa Flavonoid

Sampel yang dilarutkan dalam 2 mL dengan pelarut etanol, kemudian serbuk Mg dan HCL pekat ditambahkan sebanyak 5 tetes. Dengan terbentuknya warna jingga atau merah terindikasi adanya senyawa flavonoid.

- Uji senyawa tannin

Pereaksi FeCl_3 ditambahkan dengan sampel sebanyak 2 mL. Dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan terindikasi senyawa tannin.

- Uji senyawa saponin

Pada tabung reaksi sampel sebanyak 2 mL dilarutkan dalam aquades lalu ditambahkan 10 tetes KOH serta dipanaskan selama 5 menit dalam penangas air 50°C , setelah itu dikocok. Jika selama 15 menit membentuk busa dengan tinggi 1 cm dan tetap terindikasi adanya senyawa saponin.

- Uji Senyawa alkaloid

1 mL HCL dan 9 mL aquades dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 gr ekstrak daun mangga, selama 2

menit dipanaskan diatas penangas air, kemudian didinginkan dan disaring. Kemudian ditetaskan filtratnya dalam gelas arloji menggunakan 2 preaksi alkaloid yaitu (Dragendorf dan mayer). Hasil Uji positif diindikasikan bila terbentuk endapan merah hingga jingga dengan dragendorf serta endapan putih kekuningan dengan pereaksi mayer.

3.6.5 Uji analisis Kadar Hambat Minimum (KHM)

Metode yang digunakan dalam analisis KHM sama dengan penentuan uji aktivitas antibakteri, yaitu dengan difusi agar menggunakan metode sumuran. Pengujian antibakteri ini digunakan pengenceran bakteri *Propionibacterium acnes* dengan konsentrasi 1×10^8 CFU/mL. Media nutrisi agar yang steril dituang kedalam cawan petri sebanyak 20 mL, kemudian ditambahkan suspensi bakteri, lalu didiamkan sampai media memadat. Media yang sudah padat tersebut kemudian ditempatkan pada lubang sumuran dengan diameter 7 mm dan terdapat 4 sumur pada setiap cawan petri. Ekstrak daun mangga arumanis ditimbang sesuai dengan konsentrasi yang akan diteliti, yaitu 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,6%; 0,3% kemudian dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Ekstrak kemudian dimasukkan pada lubang sumuran dengan volume hingga 50 μ L (masing-masing variasi konsentrasi) lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C dimasukkan dalam *anaerob*. Setelah inkubasi, diameter daya hambat diukur dengan

melihat area zona bening dengan menggunakan jangka sorong. Kontrol positif menggunakan gel clindamycin dan kontrol negatif menggunakan DMSO10% (Wahyuningsih *et al*, 2021).

3.6.6 Peremajaan bakteri *Propionibacterium acnes*

Peremajaan bakteri *Propionibacterium acnes* 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. Dan untuk jarum ose cukup dipanaskan di atas api bunsen (Kindangen *et al*, 2018).

2. Prosedur pembuatan media

Media NA ditimbang sebanyak 0,28 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 20 mL. Kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate*, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu didiamkan pada suhu ruangan beberapa saat, setelah itu media dituangkan dalam cawan petri dengan volume 20 mL, biarkan media memadat. Selanjutnya media disimpan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 24°C untuk menguji sterilitasnya.

3. Peremajaan bakteri *Propionibacterium acnes*

Pada mikroorganisme uji yang diperoleh dilakukan peremajaan kultur murni. Kultur murni diambil menggunakan jarum ose kemudian digoreskan pada media agar secara aseptis. Setelah itu masukkan media agar yang telah ditanam bakteri murni kedalam *anaerob*, selanjutnya dilakukan inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C untuk *Propionibacterium acnes*. (Dyah ayu, 2013).

3.6.7 Formulasi sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis

Pembuatan formulasi sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Genatrika Erza, 2016.

Tabel 3.2 Formulasi sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis

Nama Bahan	Fungsi	Formula				
		F1	F2	F3	Control	Control (+)
		%	%	%	(-)	
Ekstrak etanol daun mangga arumanis	Zat aktif	5	10	15	-	Gel clindamycin
Asam stearate	pengemulsi	15	15	15	15	
Trietanolamin (TEA)	Zat pengasam	1,5	1,5	1,5	1,5	

Malam putih	Stabilisator emulsi	2	2	2	2
Vaselin putih	Basis krim	8	8	8	8
Metil paraben	Zat pengawet	0,12	0,12	0,12	0,12
Propilen glikol	Humektan	8	8	8	8
Pewangi (parfum)	Pewangi	5 gtt	5 gtt	5 gtt	5 gtt
Aquades	Pelarut	Ad 100 mL	Ad 100 mL	Ad 100 mL	Ad 100 mL

3.6.8 Prosedur Pembuatan Formulasi Krim

Pembuatan formulasi krim M/A mengacu pada penelitian Genatrika erza, 2016:

Siapkan alat dan bahan



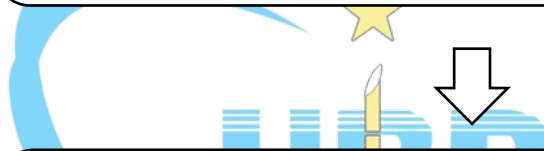
Timbang bahan sesuai formulasi yang sudah dihitung



Asam stearat, malam putih, dan vaselin putih dileburkan diatas penangas air pada suhu 75°C (Fase minyak)



Trietanolamin dan propilen glikol dileburkan diatas penangas air pada suhu 75°C



Fase air yang telah dilebur dicampur dalam mortir yang hangat yang sudah terdapat fase minyak dan digerus ad homogen hingga terbentuk basis krim



Setelah terbentuk basis krim, kemudian tambahkan aquades panas sebagai pelarut ke dalam mortir gerus ad homogen, selanjutnya tambahkan metil paraben sebagai pengawet



Setelah krim dingin kemudian tambahkan ektrsak etanol daun mangga arumanis kedalam basis krim tersebut dan tambahkan 5 tetes pewangi aduk ad homogen.

3.6.9 Pengujian aktivitas antibakteri sediaan krim

Pengujian aktivitas antibakteri pada sediaan krim 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. Untuk jarum ose dipanaskan diatas api bunsen (Kindangen et al.,2018).

2. Prosedur pembuatan media

Media NA ditimbang sebanyak 0,28 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 20 mL. Kemudian dipanaskan dengan menggunakan hot plate, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu didiamkan pada suhu ruangan selama 30 menit sampai media memadat.

3. pembuatan media suspensi

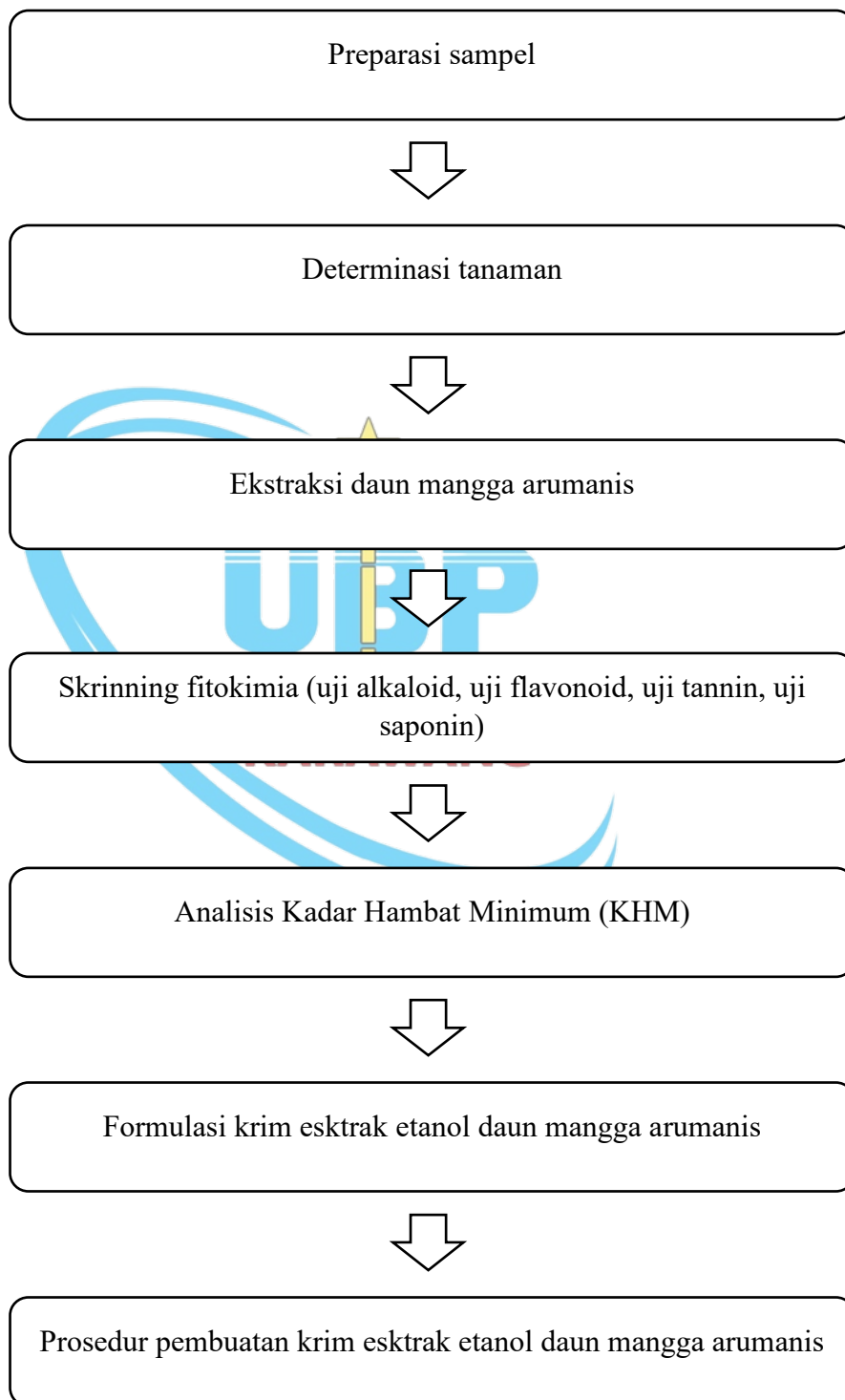
Tabung reaksi yang telah di sterilkan dimasukkan 10ml larutan NaCl 0,9%. Sterilisasi jarum ose steril dengan cara dibakar menggunakan api Bunsen, setelah jarum ose disterilisasi menggunakan api Bunsen tunggu beberapa saat sampai jarum ose tidak terlalu panas, selanjutnya ambil kultur bakteri menggunakan jarum ose dan masukkan jarum ose ke dalam tabung reaksi yang terdapat larutan NaCl 0,9%. Pembuatan suspensi bakteri sampai

didapat kekeruhan yang sesuai dengan standar kekeruhan Mac Farland 0,5%. (Agustina *et al.*,2013).

4. Uji aktivitas antibakteri sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*

Metode yang digunakan yaitu metode sumuran. Metode ini terdiri dari 4 lubang untuk formula krim tipe M/A, kemudian 1 lubang untuk kontrol positif, dan 1 lubang untuk kontrol negatif. Pengujian dimulai dengan membuat suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dengan standar kekeruhan larutan MacFarland 0,5%, selanjutnya pada media agar yang telah memadat, diambil suspensi bakteri sebanyak 100 μ L menggunakan mikropipet, sebar suspensi bakteri tersebut ke dalam media agar yang telah memadat dan tunggu beberapa saat. Selanjutnya dibuat 4 buah sumuran pada media agar dengan menggunakan alat pencadang atau lubang tipis dengan ukuran 7 mm (Muljono, *et al.* 2016). Tiap lubang tersebut diberi sebanyak 0,1 gr sediaan. Perlakuan tersebut dilakukan secara steril di dalam *laminar air flow*, setelah selesai masukkan media agar kedalam *anaerob jar*, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Zona hambat diperoleh dengan mengukur diameter daerah bening pada masing-masing sampel di sekitar sumuran dengan menggunakan jangka sorong.

3.6.10 Diagram alir prosedur penelitian





Pengujian aktivitas antibakteri terhadap sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanis

3.7 Evaluasi kestabilan sediaan krim

1. Uji sentrifugasi

Sebanyak 5 gram sediaan krim dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3750 rpm pada radius sentrifugasi selama 30 jam karena hasilnya ekivalen dengan efek gravitasi selama 1 tahun. System emulsi yang stabil menunjukkan tidak terjadinya pemisahan fase setelah dilakukan sentrifugasi (Wulandari, 2016).)

2. Pengujian jangka pendek

Pengujian stabilitas jangka pendek digunakan untuk menilai stabilitas krim ekstrak etanol daun mangga arumanis setelah penyimpanan selama 28 hari. Sampel disimpan dalam kemasan terakhirnya selama pengujian dengan 3 kondisi penyimpanan pada suhu ruang 27°C, suhu dingin 4°C dan suhu panas 40°C. Krim ekstrak etanol daun mangga arumanis diperiksa dengan interval waktu penyimpanan hari ke 0, 7, 14, 21, dan 28. Dengan pemeriksaan organoleptik, homogenitas, pH, daya lekat, daya sebar, serta viskositas (Hamsinah, 2019).

1. Uji organoleptik

Uji Organoleptik dilakukan dengan cara visual dan dilihat secara langsung dengan mengamati bentuk, warna, dan bau (Husnani & Rizki, 2019).

2. Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aspek homogenitas sediaan krim yang telah dibuat. Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan 3 bagian atas, tengah dan bawah dari sediaan krim pada kaca transparan. Dikatakan memenuhi syarat apabila tidak ada butiran kasar di sekeping kaca yang transparan maka dinyatakan memenuhi syarat uji homogenitas (Husnani & Rizki, 2019).

3. Uji pH

Uji pH bertujuan mengetahui keamanan sediaan krim saat digunakan sehingga tidak mengiritasi kulit. Pengujian dilakukan dengan cara timbang sediaan krim ekstrak etanol daun mangga arumanus sebanyak 1 gram, kemudian masukkan pH meter ke dalam sediaan. pH sediaan yang baik sesuai dengan pH kulit yaitu berkisar antara 4,5 – 6,5 (Tranggono dan Latifa, 2007; Parwanto *et al*, 2013; Edy *et al*, 2016). Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing formula.

4. Uji daya sebar

Uji daya sebar bertujuan untuk mengetahui kemampuan daya sebar krim saat diaplikasikan pada kulit. Timbang 0,5 gr krim ekstrak etanol daun mangga arumanis, lalu letakkan ditengah cawan petri dengan posisi terbalik, didiamkan selama 1 menit dan diberi beban 50 gram sampai 250 gram setiap 1 menit. Lalu diukur daya sebar krim secara horizontal dan vertikal. Standar daya sebar krim yaitu 5 cm – 7 cm (Ulaen *et al*, 2012; Parwanto *et al*, 2013; Edy *et al*, 2016). Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing formula.

6. Uji viskositas

Uji viskositas bertujuan untuk mengetahui kekentalan dari sediaan krim yang diharapkan agar mudah dioleskan. Uji viskositas dilakukan dengan cara krim dimasukkan ke dalam wadah berbentuk tabung lalu dipasang spindle 6. Spindle harus terendam dalam sediaan uji. Viskometer lammy dinyalakan dan dipastikan rotor dapat berputar pada kecepatan 60 rpm. Diamati jarum penunjuk dari viskometer yang mengarah ke angka pada skala viskositas lalu dicatat dan dikalikan faktor 100 (Zuklarnanin, 2013). Syarat uji viskositas yang baik adalah 2000cp – 50.000cp (Elcistia & Abdul, 2018).

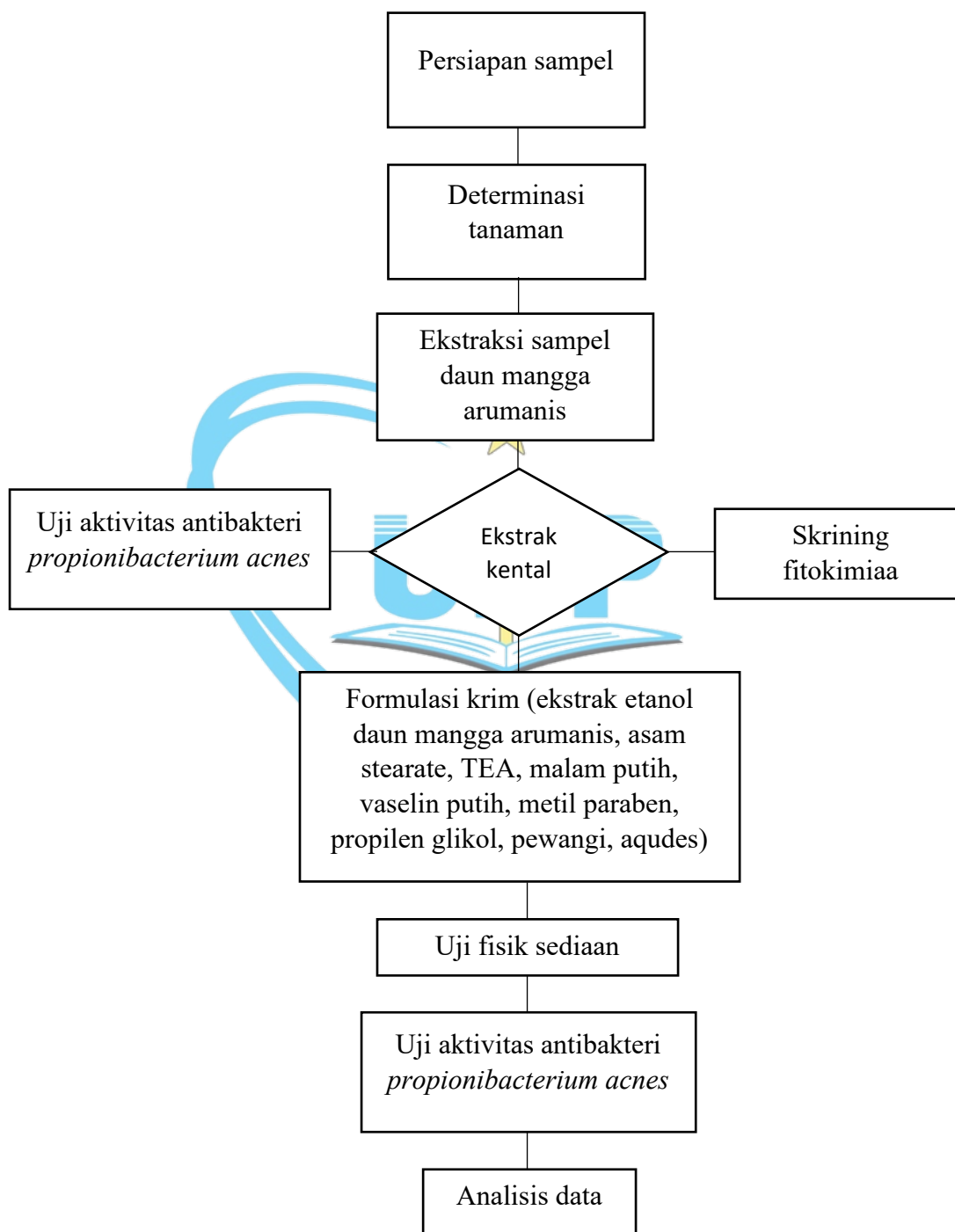
7. Uji daya lekat

Pengujian daya lekat ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan krim melekat pada tempat aplikasinya. Uji daya lekat dilakukan dengan cara ditimbang sediaan krim sebanyak 0,5 gr lalu dioleskan pada plat kaca dan diberi beban seberat 250 gram selama 5 menit. Beban diangkat dan dua plat kaca berlekatan dilepaskan sambil dicatat waktu sampai kedua plat saling lepas. Standar daya lekat krim yang baik yaitu >4 detik (Ulaen *et al*, 2012; Parwanto *et al*, 2013; Edy *et al*, 2016). Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing formula.

3.8 Analisis data

Data evaluasi sifat fisik krim meliputi organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat krim dan stabilitas dianalisis secara deskriptif, sedangkan data hasil evaluasi krim berupa pengujian aktivitas antibakteri pada sediaan krim dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%.

3.9 Diagram alir penelitian



3.10 Jadwal kegiatan

Tabel 3.3 Jadwal Kegiatan Penelitian

Kegiatan	Bulan ke-								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Studi literature									
Penulisan proposal									
Seminar proposal									
Pelaksanaan penelitian									
Pengolahan dan analisis data									
Penulisan tugas akhir									
Sidang tugas akhir									

