

BAB III

METEDOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental, pada penelitian ini akan dilakukan pembuatan formulasi gel *Hand Sanitizer* dari ekstrak etanol bunga telang yang akan di uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus*. Pembuatan formulasi serta pengujian aktivitas antibakteri bertujuan untuk mengetahui efektivitas anti bakteri *Staphylococcus aureus* dari sediaan ekstrak etanol bunga telang.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Aquades, Aquades steril, Carbopol, bunga telang (*Clitoria ternatea* L), Etanol 96%, Gliserin, Metilparaben, *Staphylococcus aureus*, TEA, HCl 2N, kloroform, serbuk magnesium, reagen dragendorf, amil alkohol, gelatin 1%.

3.2.2 Alat

Cawan petri, Gelas Kimia/Beaker gelas, *Laminar Air Flow* (LAF), Mortir, PH meter (HANNA Instumen), Propipet, Stamper, Timbangan analitik (Lutron GM-300P), Autoclaf, Ose, Blue tip, Batang pengaduk, Oven.

3.3 Lokasi Penelitian

Lokasi Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam, dan Laboratorium Teknologi Universitas Buana Perjuangan Karawang, penelitian ini dilaksanakan dari bulan November-Juni 2022.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu formula sediaan gel *Hand Sanitizer* ekstrak bunga telang yang diperoleh diambil dari sampel dengan konsentrasi yaitu 2,5%, 5% dan 7,5%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pengujian organoleptis, viskositas, daya lekat, diameter daya sebar, pH dan homogenitas.

3. Definisi Operasional Variabel

Berikut ini adalah tabel definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini, dapat dilihat pada Tabel 3.1 :

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1.	Stabilitas sampel gel handsanitizer ekstrak bunga telang	Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu ekstrak bunga telang yang diperoleh diambil dari sampel dengan konsentrasi	Pengujian kimia fisika meliputi organoleptis (warna, bau), homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, dan spesifikasi	-	1: control negative 2: control positif 3 : F 2,5 4 : F 5 5: F 7,5

yaitu 2,5%, 5
%, dan 7,5%.

Variabel Terikat

2	Warna	Parameter fisik menggunakan indera mata dalam pengujian	Uji organoleptik	Nominal	1.
3	Bau	Parameter fisik menggunakan indera penciuman dalam pengujian gel <i>Hand Sanitizer</i> ekstrak bunga telang	Uji organoleptik	Nominal	1. Bau lemah
4	pH	Nilai pH pada sediaan gel <i>Hand Sanitizer</i> ekstrak bunga tulang yg	pH Meter	Rasio	Angka dalam pH meter

ditunjukkan
sesuai dengan
pH kulit oleh
pH meter

5	Daya Sebar	diletakkan di Kaca tengah cawan berdiameter petri yang telah ditempeli	bulat Rasio	Diameter daya sebar dalam kaca bulat berdiameter.
---	------------	---	-------------	--

dengan kertas
millimeter blok.
Penyebaran gel
diukur dengan
diameter gel
yang menyebar
dari dua sisi
setelah
dibiarkan
selama 1 menit.



6	Uji homogenitas	Uji homogenitas dilakukan dengan mengoleskan sediaan gel	Uji homogenitas menggunakan kaca objek	Nominal	1. Tidak homogen 2. Homogen
---	-----------------	--	--	---------	--------------------------------

Hand Sanitizer

eskrak etanol

bunga telang

pada kaca

objek,

kemudian

dikatupkan

dengan kaca

objek yang

lainnya untuk

diamati

homogenitasnya



3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi

Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran bahan yang digunakan pada penelitian. Identifikasi tanaman dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

3.6.2 Pembuatan simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea* L)

Berikut ini merupakan proses pembuatan simplisia Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) :

1. Mengumpulkan bahan baku yang akan dijadikan simplisia (berupa bunga telang),

2. Melakukan sortasi basah dengan memilih bahan baku dan memisahkannya dari bahan baku yang sudah tidak layak lagi atau dari kotoran,
3. Mencuci bahan baku dengan air mengalir sampai bersih,
4. Mengeringkan bahan baku secara tidak langsung (tidak dibawah sinar matahari langsung),
5. Melakukan sortasi kering dengan cara memilih bahan baku dari bahan- bahan yang rusak atau terkena kotoran,
6. Menghaluskan bahan baku dengan cara menmbuk atau menggunakan blender hingga menjadi partikel - partikel kecil (Riyanto *et al.*, 2019).

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L)

Berikut ini merupakan proses pembuatan ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L) :

1. Simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea* L) ditimbang sebanyak yang dibutuhkan,
2. Simplisia dimaserasi dengan etanol 96%,
3. Ditutup dan dibiarkan selama 3 hari di tempat yang terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk,
4. Disaring menggunakan kertas saring rangkap kemudian filtrat dimasukan ke dalam *beaker glass* dan ditutup dengan alumunium foil,
5. Dilakukan remaserasi selama 2 hari dengan cara merendam

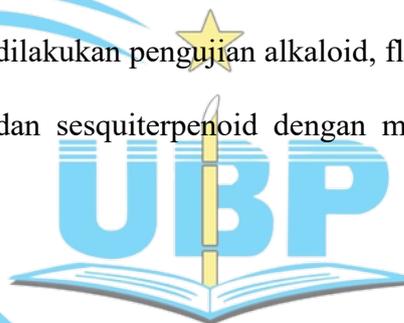
- kembali ampas dengan etanol 96% sambil sesekali diaduk,
6. Semua filtrat dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*,
 7. Dilakukan pengentalan ekstrak menggunakan *waterbath* (Riyanto *et al.*, 2019).

3.6.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan menguji simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea* L) untuk melihat ada atau tidaknya senyawa fitokimia. Dalam penelitian ini dilakukan pengujian alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan monoterpenoid dan sesquiterpenoid dengan mengacu pada (Harborne, 1987).

A. Uji Alkaloid

Sebanyak 1 gram sampel dibasahkan dengan ammonia. Tambahkan kloroform sebanyak 5 ml gerus dengan kuat, lapisan kloroform dipipet dan disaring menggunakan pipet yang disumbat dengan kapas, lalu di masukan ke dalam tabung reaksi. Dalam tabung reaksi tambahkan HCl 2N (1:10 v/v). Kocok kuat hingga terbentuk 2 lapisan, lapisan asam dipipet dan dibagi menjadi 3 bagian. Filtrat ke-1 ditambahkan reagen mayer, terbentuknya endapan menandakan adanya alkaloid. Filtrat ke-2 ditambahkan reagen dragendorff, terbentuknya endapan jingga atau coklat menandakan hasil positif alkaloid. Filtrat ke-3 sebagai blanko.



B. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 gram sampel dilarutkan dalam 50 ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan sedikit serbuk Magnesium dan 5 ml HCl 2N, tambahkan amil alkohol, lalu kocok kuat-kuat dan dibiarkan hingga memisah. Terbentuknya warna kuning hingga merah (atau warna tertentu) menunjukkan adanya flavonoid.

C. Uji Tanin

Sebanyak 50 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dididihkan dalam 50 ml air selama 15 menit, kemudian dinginkan dan disaring (Filtrat A). Kemudian kedalam sejumlah filtrat A tambahkan gelatin 1%. Terbentuknya endapan putih menunjukkan hasil positif tanin.

D. Uji Saponin

Sejumlah Filtrat A dikocok secara vertikal dalam tabung reaksi selama 10 detik, tambahkan HCl 2N. Terbentuknya busa yang persisten pada penambahan HCl 2N atau pada pendiaman selama 10 menit menunjukkan adanya golongan saponin.

E. Uji Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid

Sebanyak 1 gram sampel digerus dengan 5 ml eter, kemudian pipet dengan pipet yang disumbat kapas (filtrat B). Filtrat B dimasukkan dalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Dalam residu teteskan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat melalui pinggir cawan. Terbentuknya warna-warna menunjukkan hasil positif mono dan sesquiterpene.

3.6.5 Formulasi Sediaan Gel *Hand Sanitizer* Ekstrak Bunga Telang

Formulasi sediaan gel *Hand Sanitizer* ini mengacu pada penelitian (Lili Widyawati, 2017)

Tabel 3.2 Formulasi Gel *Hand Sanitizer*

Nama Bahan	Formula				Kontrol positif	Fungsi
	F1	F2	F3	Kontrol negative		
Ekstrak etanol bunga telang	2,5%	5%	7,5%	-	Detol	Zat aktif
Carbopol	0,4 gr	0,4 gr	0,4 gr	0,4 gr	-	Basis gel
Metil paraben	0,2 gr	0,2 gr	0,2 gr	0,2 gr	-	Pengawet
TEA	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	-	Alkalizing
Gliserin	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	-	Emollien
Aquades	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	-	Pelarut

3.7 Evaluasi Sediaan fisik Gel *Hand Sanitizer*

Pengujian yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain :

3.7.1 Uji Organoleptik

Uji organoleptis dilakukan secara visual terhadap sediaan gel, meliputi warna, bau dan bentuk gel, mudah dioleskan, dan tidak mengandung butiran-butiran kasar. Skala penilaian 1 - 4 sebagai berikut: 1 (tidak sesuai), 2 (kurang sesuai), 3 (sesuai), 4 (sangat sesuai).

3.7.2 Diameter Daya Sebar

Gel 0,5 gram diletakkan di tengah cawan petri yang telah ditempel dengan kertas millimeter blok. Penyebaran gel diukur dengan diameter gel yang menyebar dari dua sisi setelah dibiarkan selama 1 menit. Pengukuran diameter gel dimulai tanpa beban, kemudian ditambahkan beban 50 gram, 100 gram, 150 gram, 200 gram, sampai diperoleh daya sebar yang konstan dan dicatat diameter penyebaran gel setelah 1 menit.

3.7.3 Uji pH

Sampel ditimbang sebanyak 1 gram. Sebanyak 10 mL aquades pH 7 ditambahkan, lalu dilakukan pengadukan. Setelah homogen dilakukan pengukuran pH dengan cara masukan pH meter yang telah dikalibrasi, didiamkan beberapa saat sehingga didapat pH yang tetap.

3.7.4 Homogenitas

Pemeriksaan homogenitas sediaan dapat dilakukan dengan cara, sediaan dioleskan pada dua keping kaca atau bahan transparan lain yang cocok, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (DitjenPOM, 2000).

3.7.5 Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan cara meletakkan gel (secukupnya) diatas obyek glass yang telah ditentukan luasnya. Letakkan obyek glass yang lain diatas gel tersebut tekanlah dengan beban 1 kg selama 5 menit. Pasanglah obyek glass pada alat. Lepaskan beban seberat 100 g dan catat waktunya hingga kedua obyek glass tersebut terlepas (Galeri, 2015).

3.7.6 Uji Viskositas

Alat yang digunakan untuk mengukur viskositas adalah visikometer brookfield LV. Gel dimasukan kedalam wadah kemudian dipasang spindel ukuran 4 ke alat viskometer dan rotor dijalankan dengan kecepatan 30 rpm. Setelah kecepatan menunjukkan angka yang stabil, hasilnya dicatat kemudian dikalikan dengan faktor 200 (Nabela, 2017).

3.7.7 Uji Efektifitas Antibakteri *Staphylococcus aureus*

A. Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat dan bahan yang akan digunakan dicuci, dibungkus, dan diseterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas seperti cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, pipet volume dimasukkan ke dalam oven (pemanasan kering) dan disterilkan pada suhu 175°C selama 2 jam. Alat dan bahan yang tidak tahan pemanasan kering seperti media, tips dimasukkan dalam autoclave (pemanasan basah) pada suhu 121°C selama 15 menit.

B. Pembuatan media

NA Media padat NA 9,5 g dilarutkan dalam aquadest steril 250 mL dan dipanaskan hingga melarut. Kemudian diseterilisasi dengan autoclave 121°C selama 15-20 menit. Media yang telah steril dimasukkan ke dalam cawan petri di ruangan LAF.

C. Pembuatan stok bakteri dan suspensi bakteri

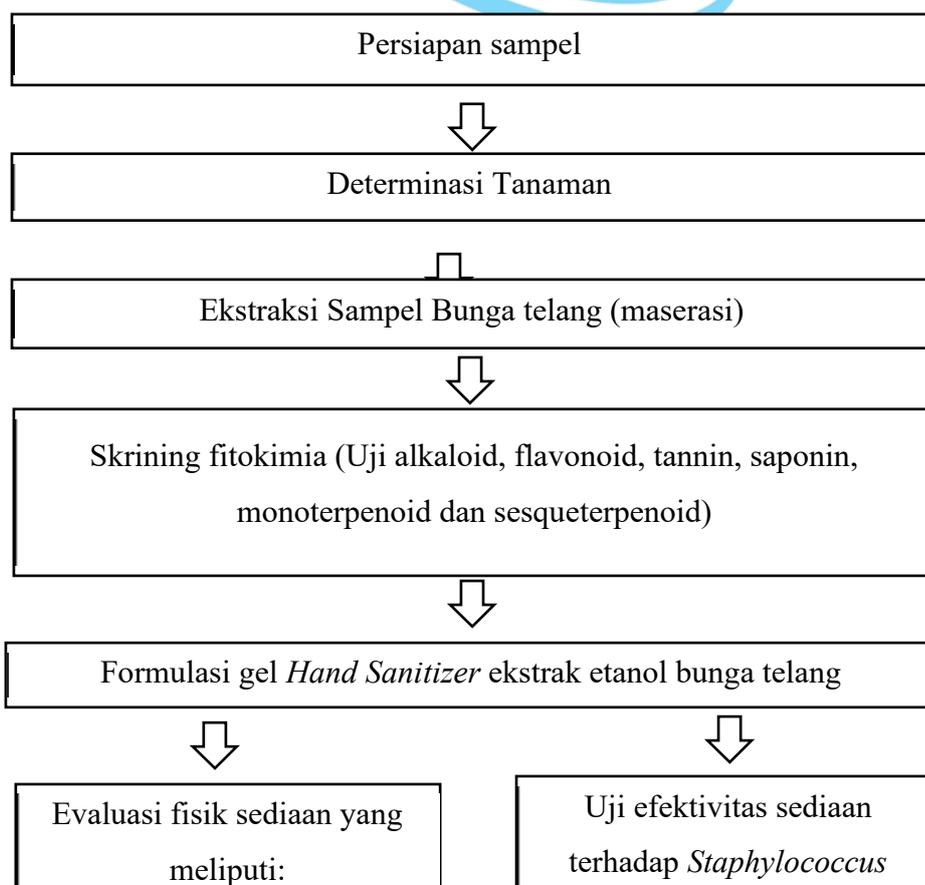
Media yang telah mengeras diambil dan digoreskan bakteri secara streak plate, dan diinkubasi selama 24 jam. Suspensi bakteri

dibuat dengan cara mengambil beberapa koloni tunggal yang telah dikultur dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9. Setelah itu dibandingkan dengan kekeruhan larutan standar *Mc.Farland*.

D. Uji antibakteri

Uji antibakteri dengan metode difusi sumuran dengan cara membuat 5 sumuran pada media yang telah diinokulasikan dengan bakteri *Staphylococcus aureus* 200 µl untuk formula I, formula II, formula III, formula IV, kontrol negatif dan kontrol positif (gel *Hand Sanitizer* detol yang mengandung zat aktif alkohol), ke dalam sumuran tersebut diisi 1 gram formula gel *Hand Sanitizer* yang dibuat dengan cetakan cork borner. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diukur diameter zona hambatnya (zona radikal) dengan menggunakan penggaris (Sorbareyah, 2015).

3.8 Alur Penelitian





Gambar 3.1 Skema alur penelitian

3.9 Analisis Data

Analisi data dilakukan dengan melakukan pengujian yang telah di observasi dari segi fisik meliputi uji organoleptis, uji pH, uji homogenitas, uji viskositas, uji daya lekat, dan uji daya sebar gel *Hand Sanitizer*. Penelitian ini menggunakan analisis data kualitatif dan kuantitatif. yaitu dengan menguji kualitas bahan dan gel *Hand Sanitizer* yang dihasilkan sedangkan kuantitatif dilakukan dengan cara menghitung rata-rata dan formula yang diuji diantaranya pH, viskositas, daya lekat, daya sebar dan uji antibakteri.