

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Metode penelitian ini dilakukan dengan cara eksperimental, melakukan uji antibakteri terhadap *P. acnes*. Penelitian ini menguji aktivitas antibakteri dari sediaan gel serum Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* L) Terhadap *P. acnes* dengan menggunakan metode difusi sumuran. Pengujian dikerjakan secara triplo dimana konsentrasi yang digunakan tiap formula yaitu 0%, 1,5%, 2% dan 2,5%. Konsentrasi formula diperoleh dari hasil Uji KHM (Konsentrasi Hambat Minimum). Setiap sampel melalui pengujian Skrining Fitokimia dan Uji antibakteri.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol 96% daun bidara yang diperoleh dan diekstraksi di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO) di Dusun Karangmalang III, Desa Karangmalang, Kecamatan Kasreman, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur. Daun Bidara yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan waktu pemetikan sore hari. Dari hasil ekstraksi yang didapatkan dari berat simplisia 1000 gram menghasilkan berat ekstrak 103,9 gram dan rendemen 10,39 %.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\% \quad \frac{103,9}{1000} \times 100\% = 10,39 \%$$

3.3 Bahan Dan Alat

3.3.1 Bahan

Bahan Penelitian yang akan digunakan antara lain ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritina* L), etanol 96%, Dinatrium EDTA, Natrium Benzoat, Gliserin, Trietanolamin, Carbomer, BHI (*Brain Heart Infusion*), NaCl, macfarland 0,5 dan aquadest.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu botol gel serum, timbangan analitik (*Electronic scale*), penangas air, gelas ukur (IWAKI), corong glass (PYREX), tabung reaksi (IWAKI), cawan porselin, erlenmeyer (IWAKI), batang pengaduk, mortir dan stamper, viscometer (LR Lamy Rheology Instruments), pH meter (PH/ISE Meter pH-240L), *obyek glass*, aluminium foil, pipet tetes, kompor listrik, cawan petri, lampu spiritus, kompor listrik (maspion), jarum ose, anaerob jar (*BBL GasPak Anaerobic Systems*), Mikropipet (*Fisherbrand*), batang sumuran, mikropipet (Fisherbrand Elite), autoklaf (GEA medical YX-24 LDJ), inkubator (LAB INCUBATOR Digital #IN-601 Gemmyco), Jangka sorong (Vernier Caliper) *colony counter*, LAF (*Laminar Air Flow*) (*mascotte*).

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dilakukan dari bulan april 2022 sampai Juli 2022.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah empat variasi formula sediaan gel serum Ekstrak Etanol Daun Bidara dengan konsentrasi berturut-turut yaitu 0%, 1,5%, 2% dan 2,5% ekstrak kental etanol daun bidara.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah evaluasi sediaan fisik dari sediaan gel serum ekstrak etanol daun bidara yang meliputi: Uji pH, Uji homogenitas, Uji organoleptis, Uji viskositas, Uji daya sebar,

3.5.3 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel terdapat pada penelitian ini diajukan pada Tabel 3.1 sebagai berikut :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas					
1	Formula gel serum ekstrak daun bidara	Konsentrasi yang diperoleh dari sampel yang dibuat dengan variasi konsentrasi	Penelitian Meliputi pengukuran pH, Uji homogenitas, Uji organoleptis (warna dan bau), Uji viskositas, Uji Daya Sebar, Uji Antibakteri	Nomina 1	1. F 0 2. F 1,5% 3. F 2% 4. F 2,5%
Variabel Terikat					
2	pH	Nilai pH sediaan serum disesuaikan	pH meter	Rasio	Angka dalam pH

		dengan pH kulit wajah			meter
3	Homogenitas	Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan serum pada kaca objek	Kaca Objek	Ordinal	1. Tidak Homogen 2. Homogen
		untu kdiamati homogenitasnya			
4	Warna	Dilakukan dengan menggunakan indera penglihatan dalam pengujian sediaan serum	Panca indera	Ordinal	1. Bening 2. Hijau muda 3. Hijau pekat
5	Bau	Dilakukan dengan menggunakan indera penciuman dalam pengujian sediaan serum	Panca indera	Ordinal	1. Tidak berbau 2. Bau khas
6	Daya Sebar	Kemampuan penyebaran pada sediaan serum	Ekstensometer	Rasio	Cm (centimeter)
7	Antibakteri	Pengujian berdasarkan nilai daya hambat pada	-	Rasio	mm (milimeter)

media					
8	Viskositas	Menguji kekentalan pada sediaan gel serum	Viscometer	Rasio	Cps (centipoises)
9	Skrining Fitokimia Flavonoid	Skrining Fitokimia Adalah pengujian Dengan pereaksi Yang ditandai dengan adanya Perubahan warna Yang mendakan Terdapatnya senyawa flavonoid pada suatu tanaman	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
10	Skrining Fitokimia Alkaloid	Skrining Fitokimia Adalah pengujian Dengan pereaksi Yang ditandai dengan adanya Perubahan warna Yang mendakan Terdapatnya senyawa alkaloid pada suatu tanaman	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
12	Skrining Fitokimia Tanin	Skrining Fitokimia Adalah pengujian Dengan pereaksi Yang ditandai Dengan adanya Perubahan warna Yang mendakan terdapatnya senyawa tanin pada suatu tanaman	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif

13	Skrining Fitokimia Polifenolat	Skrining Fitokimia Adalah pengujian Dengan pereaksi Yang ditandai Dengan adanya Perubahan warna Yang mendakan terdapatnya senyawa polifenolat pada suatu tanaman	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
----	--------------------------------------	---	----------	---------	--------------------------

3.6 Prosedur Penelitian

Berikut ini merupakan prosedur kerja dari penelitian kali ini :

3.6.1 Determinasi Tanaman

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

3.6.2 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol 96% daun bidara yang diperoleh dan diekstraksi di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO). Di Dusun Karangmalang III, Desa Karangmalang, Kecamatan Kasreman, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur. Daun Bidara yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan waktu pemetikan sore hari.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana L*)

Metode yang digunakan untuk ekstraksi yaitu maserasi. Dengan perbandingan simplisia dan pelarut 1 : 5. Bobot sampel simplisia yang digunakan 1000 gram dan pelarut sebanyak 500 ml. Ekstrak kental yang diperoleh yaitu se

Daun bidara (*Ziziphus mauritiana L*) yang sudah kering dihaluskan kemudian ditimbang dan dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan etanol 96% hingga sampel terendam secara merata. Sampel daun bidara yang telah direndam etanol 96% dilakukan pengadukan selama 30 menit. Wadah maserasi ditutup dan disimpan selama 24 jam diruangan yang terlindung dari sinar matahari. Hasil maserasi disaring dan dipisahkan antara ampas dan filtrat. Filtrat hasil ekstraksi kemudian dipekatkan dalam *vacuum rotary evaporator* dan cairan penyaringnya diuapkan hingga mendapatkan ekstrak etanol 96% daun bidara pekat dan siap digunakan (azizah, 2018).

3.6.4 Skrining Fitokimia

Berikut merupakan skrining fitokimia dari ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus mauritiana L*), filtrat dilakukan dengan cara 1gr ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana L*) ditambahkan 50 ml aquadest, dipanaskan dengan cara didihkan sampai 5 menit. Saring filtrat.

1) Flavonoid

Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu tambahkan Serbuk Mg sebanyak secukupnya dan HCL 2 tetes, kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga. (Nugrahani,2016)

2) Alkaloid

Filtrat dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi, yang pertama ditambahkan preaksi mayer yang akan menghasilkan endapan putih, dan yang kedua ditambahkan preaksi dragendorf apabila menghasilkan endapan merah jingga maka positif mengandung alkaloid. (Nugrahani, 2016)

3) Tanin

Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan gelatin 1%. Uji positif tanin ditandai dengan terbentuknya endapan putih (Fikayuniar, 2020).

4) Polifenolat

Filtrat ditambahkan larutan pereaksi FeCl₃ 1% terbentuknya warna biru hitam menunjukkan adanya polifenolat. (Fikayuniar, 2020).

3.6.5 Uji KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) Ekstrak Etanol Daun

Bidara (*Ziziphus mauritiana* L)

Metode Pengujian kadar hambat minimum (KHM) ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana* L) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*

menggunakan metode difusi Sumuran. Pada pengujian kadar hambat minimum (KHM) diperoleh konsentrasi ekstrak etanol daun bidara yaitu : 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,1%; 1,5%; 0,75%. Media agar yang sudah steril dimasukkan ke dalam cawan petri ditunggu hingga padat kemudian dilubangi dengan batang sumuran lalu masukkan ekstrak daun bidara ke setiap lubang sumuran dengan masing-masing variasi konsentrasi. Selanjutnya diinkubasi selama 2x24 jam (48 jam) pada suhu 37°C dan dimasukkan kedalam *anaerob jar*. Setelah diinkubasi, diameter daya hambat diukur menggunakan jangka sorong. (Wahyuningsih *et al*,2021)

Menurut Maria,H (2015) aktivitas antibakteri dengan diameter area hambat ≤ 5 mm aktivitas antibakteri lemah, diameter area hambat 5-10 mm aktivitas antibakteri sedang, diameter area hambat 10-20 mm aktivitas antibakteri kuat dan diameter area hambat ≥ 20 mm aktivitas antibakteri sangat kuat.

3.6.6 Pembuatan Formula Sediaan Gel Serum Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* L)

Formula sediaan gel serum yang dibuat berdasarkan pada penelitian menurut Nuraeni, W. (2021) yang telah dimodifikasi seperti pada **Tabel 3.2** dibawah ini :

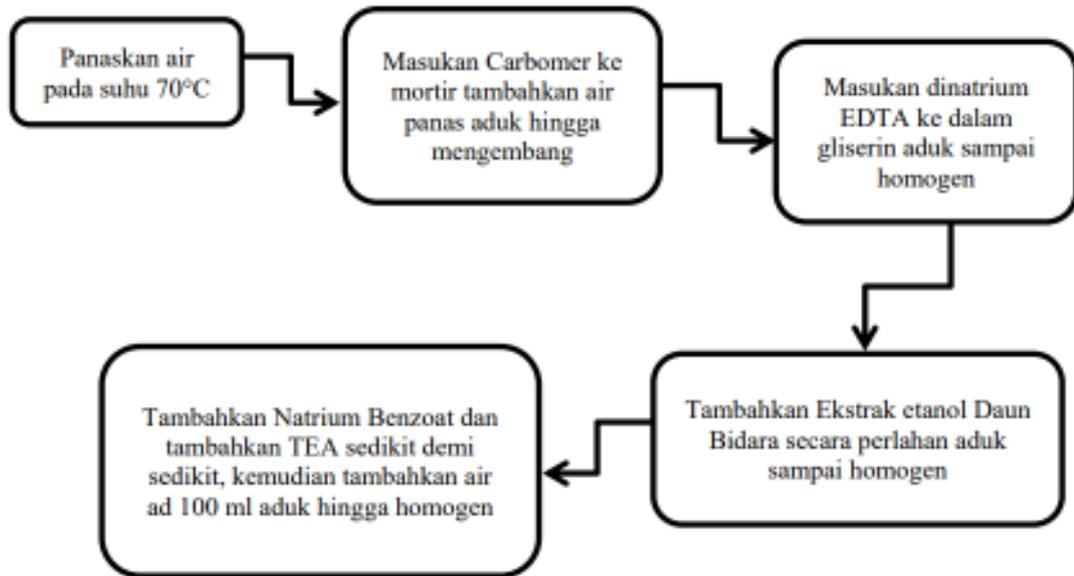
Tabel 3.2 Formulasi Gel Serum Ekstrak Daun Bidara sebanyak 100 ml

Bahan	konsentrasi				Range	Fungsi
	F0	F1,5	F2	F2,5		
Ekstrak Etanol	0%	1,5%	2%	2,5%		Zat Aktif

Daun Bidara						
Carbomer	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5-20%	Pembentuk
Gliserin	2%	2%	2%	2%	<30%	Pembasah
TEA	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%- 0,5%	Pengatur pH
Natrium Benzoat	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,01- 0,6%	Pengawet
Dinatrium EDTA (Na ₂ EDTA)	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1- 0,3%	Agen Pengkelat
Aquadest	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	-	Pelarut

3.6.7 Pembuatan Gel Serum Ekstrak Etanol Daun Bidara

Pembuatan gel serum pertama-tama yaitu melarutkan ekstrak etanol Daun Bidara menggunakan aquadest secukupnya, melarutkan dinatrium EDTA, melarutkan natrium benzoat, selanjutnya panaskan air untuk melarutkan carbomer. Setelah air mendidih masukan carbomer ke dalam mortir lalu ditambahkan 15 ml air panas aduk sampai homogen, tambahkan dinatrium EDTA yang sudah dilarutkan aduk sampai homogen, tambahkan gliserin aduk sampai homogen, tambahkan Natrium Benzoat aduk sampai homogen, tambahkan Triethanolamin aduk sampai homogen, kemudian tambahkan ekstrak daun bidara sedikit demi sedikit aduk sampai homogen.



Gambar 3.1 Pembuatan sediaan Gel Serum

3.7 Evaluasi Fisik Sediaan Gel Serum

a. Uji organoleptis

Uji organoleptis merupakan pengamatan perubahan yang meliputi warna dan bau sediaan serum ekstrak etanol Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* L)

b. Uji pH

Sediaan diukur menggunakan pH meter. Dengan cara memasukan sediaan ke dalam beaker glass, kemudian pH meter dimasukkan ke dalam sediaan. Angka yang terdapat pada pH meter merupakan nilai pH sediaan tersebut. pH kulit 4,5 – 6,5

c. Uji Homogenitas

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah partikel dalam suatu sediaan sudah homogen atau masih ada butiran kasar. Pemeriksaan ini

dilakukan dengan cara dihimpit dengan dua objek glass lalu diamati.

d. Uji Daya Sebar

Timbang sediaan sebanyak 0,5 g diletakan ditengah kaca yang telah diberikan milimeter block kemudian ditutup dengan kaca yang sama selama 60 detik, kemudian diulang setiap 60 detik dengan penambahan beban 50g, 100g, 150g dan 200g. Lalu ukur penyebarannya. Kriteria penyebaran mulai dari 5 – 7 cm.

e. Uji Viskositas

Pengujian ini dilakukan dengan cara sediaan dimasukan kedalam beaker glass 100 ml kemudian diukur viskositasnya dengan viscometer lamy rheology, kemudian diatur spindel 2 dengan kecepatan 100 rpm. Viskositas yang baik mulai 800 – 3000 cPs.

3.8 Uji Aktivitas Antibakteri *Propionibacterium acnes*

Dalam penelitian kali ini ada beberapa tahap Uji Aktivitas Antibakteri *Propionibacterium acnes* ada beberapa poin yang harus dipenuhi sebagai berikut,
:Nuraeni, W. (2021)

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan pada penelitian kali ini dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan alumunium foil. Lalu dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Untuk alat seperti jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara

dipijarkan/dipanaskan pada api menyala bunsen.

2. Peremajaan Bakteri

Dilakukan dengan cara menggoreskan bakteri *Propionibacterium acnes* ketabung reaksi yang berisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) dan diinokulasikan dengan digoreskan pada media BHI secara aseptik kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil bakteri uji dengan jarum ose steril lalu disuspensikan ke dalam vial yang berisi 10 ml NaCl 0.9% hingga memperoleh kekeruhan yang sama dengan standar 0,5 Mc. Farland. Karena sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair dengan kepadatan antara $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. (Quelab, 2005).

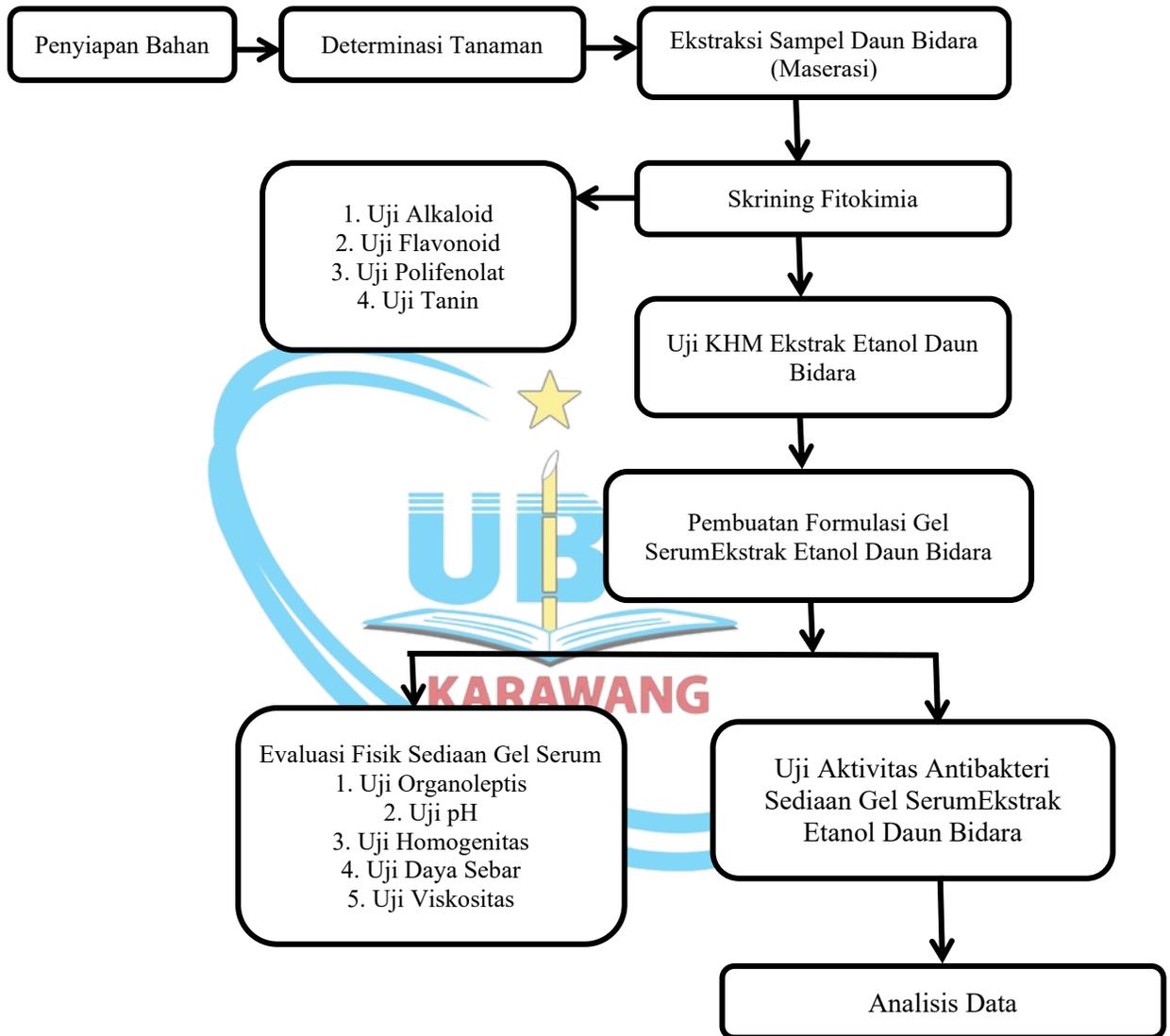
4. Pembuatan Media

Brain Heart Infusion (BHI) ditimbang sebanyak 28 gram kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan dalam 1 liter aquadest kemudian dipanaskan di atas kompor listrik hingga mendidih dan diperoleh larutan jernih. Di sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Setelah media disterilkan dan didiamkan sampai hangat kemudian masukkan 20 ml media ke dalam cawan petri tunggu hingga mengeras. Suspensi bakteri yang telah distandarkan dengan *Mc. Farland 0,5*. Uji Antibakteri

Lubangi media agar dengan batang sumuran, masukkan masing-masing konsentrasi sesuai formula yang telah ditentukan. Simpan media pada wadah tertutup rapat dan simpan anaerogen pada wadah tersebut. Inkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam.



3.9 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian

3.10 Analisis Data

Pada penelitian ini data yang diperoleh dari hasil Uji aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dianalisis menggunakan Uji *Analysis of Variance*

