

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian praeksperimental dengan mengevaluasi pembuatan tiga formula sediaan *facial wash* gel ekstrak kulit pisang kepok disertai evaluasi fisika melalui pengujian organoleptik, viskositas, pengukuran pH, homogenitas, daya sebar dan tinggi busa serta mengukur aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* sebagai *facial wash* gel anti jerawat.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan menggunakan kulit pisang kepok yang ada di kabupaten Karawang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil, autoklaf (Fison), batang pengaduk, beaker glass, benang wol, bunsen, blender, cawan petri, cawan penguap, erlenmeyer, gelas ukur, inkubator (Memmert), jangka sorong, jarum ose, kain kasa, kaca objek, kapas, kertas perkamen, kertas saring, *laminar air flow cabinet* (Astec HLF 1200 L), lumpang dan alu, kurs porselen, lemari pengering, mikro pipet (Eppendorf), mikroskop, neraca analitik (OHAUS), oven (Memmert), pH meter, pinset, pipet tetes, rotary evaporator, spatula, sudip, timbangan dan viskometer.

3.3.2 Bahan

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit pisang kepok yang ada di kabupaten Karawang. Mikroba uji yang digunakan adalah Bakteri *Propionibacterium acnes* yang diperoleh Fakultas Mikrobiologi Universitas Indonesia Cikini. Media Pembenihan Mueller Hinton Agar (MHA). Pelarut dan pereaksi yang digunakan Amil Alkohol, Aquadest, Asam asetat anhidrat, Asam klorida, Asam sulfat pekat, Etanol, FeCl₃, Kloroform, Kristal Violet, Lugol Iodin, Metylen Blue, NaNO₂, NaCl, NaOH, Serbuk Mg, BaCl₂, iodium Pereaksi Bouchardat, Pereaksi Mayer, Pereaksi Dragendorff, Carbopol, Sodium Lauril Sulfat, Glycerin, Nipagin, Nipasol, NaOH, BHT, Parfum Green Tea, Aqua, Asam Sitrat.

3.4 Variabel penelitian

Tabel 3. 1 variabel penelitian

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas					
1	Uji aktivitas antibakteri	Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok, dan uji aktivitas antibakteri sediaan <i>facial wash</i> gel dengan konsentrasi F10, F15, F20	Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram	-	-

Variabel Terikat

2	Warna	Parameter menggunakan penglihatan (mata) untuk mengetahui warna ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok.	visual indra	Uji organoleptik	Nominal	1. Hitam 2. Kuning
3	Bau	Parameter dengan indra penciuman (hidung) untuk mengetahui aroma ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok.	secara visual menggunakan indra penciuman (hidung)	Uji organoleptik	Nominal	1. Bau lemah 2. Bau tengik
4	Bentuk	Parameter objektif terhadap ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok.	secara uji	Uji organoleptik	Nominal	1. Cair 2. Agak kental 3. Kental
5	Rasa	Pengujian ekstrak etanol 70% kulit pisang kapok	rasa dari	Uji organoleptik	Nominal	1. Ada rasa 2. Tidak ada rasa
5	Skrining fitokimia	Pengujian untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit dari ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok dengan melihat perubahan	untuk kandungan	Uji skrining fitokimia	Nominal	1. Positif 2. Negatif

warna atau pun endapan.

6	Daya sebar	Uji daya sebar dari <i>facial wash</i> gel ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok dilakukan dengan cara Kaca transparan diletakkan di atas kertas milimeter blok. Pada kaca tersebut diletakkan 0,5 g krim, kemudian ditutup dengan kaca transparan yang lain dan dibiarkan selama 1 menit untuk mendapatkan beberapa diameter penyebaran yang terbentuk. Kemudian dilanjutkan dengan menambahkan beban diatas kaca transparan tersebut beban 50, 100, dan 150 g dan diamati diameter penyebaran yang terbentuk.	Uji daya sebar	Rasio	Angka hasil uji daya sebar
7	Viskositas	Uji viskositas dari <i>facial wash</i> gel ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok	Uji viskositas	Rasio	Angka hasil uji viskositas (cPs)

dengan menggunakan viscometer brookfield

8	pH	Uji pH sediaan <i>facial wash</i> gel ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok alat pH meter	Uji pengukuran pH	Rasio	Angka hasil uji pH
9	homogenitas	Uji daya sebar dari <i>facial wash</i> gel ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok dilakukan dengan cara Sediaan ditimbang sebanyak 0,1 gram. Kemudian, diletakkan diantara dua kaca <i>object</i> , lalu diperhatikan apakah terdapat partikel kasar atau ketidakhomogenan di bawah cahaya	Uji Homogenitas	Rasio	Angka hasil uji homogenitas
10	Tingkat Busa	Uji tingkat busa dari <i>facial wash</i> gel ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok dilakukan dengan cara Dimasukkan formula sabun ke dalam tabung berskala yang berisi 10 ml aquades dan kemudian di tutup. Tabung dikocok selama 20 detik dan diukur	Uji tingkat busa		Angka hasil uji tingkat busa

tinggi busa yang terbentuk.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan Bahan Baku

Kulit pisang kapok kuning di ambil secara *purposive sampling* di perkebunan masyarakat daerah Karawang, kulit pisang kapok kuning yang di dapat kemudian di rajang.

3.5.2 Determinasi

Kulit pisang kepok yang digunakan pada penelitian ini dideterminasi di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu Jl. Lahor No.87, Pesangrahan, Kec. Batu, Kota Batu, Jawa Timur.

3.5.3 Pembuatan Simplisia Kulit Pisang Kepok

Kulit pisang kapok dipilih yang sudah matang sempurna atau sudah menguning kulitnya. Kulit pisang kepok dicuci bersih (terlihat secara fisik), kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan sampai tiris airnya. Kulit pisang kepok yang sudah bersih dirajang kecil-kecil untuk mepermudah proses pengeringan, baru setelah itu ditimbang beratnya. Berat awal limbah kulit pisang kepok kuning yang sudah di rajang adalah ± 5 kg. Proses pengeringan dilakukan dengan oven pada suhu 45°C sampai kadar airnya stabil (kurang dari

10%, yaitu 8,90%) selama 5 hari. Serbuk hasil pengeringan sudah siap untuk dimaserasi.

3.5.4 Pembuatan Ekstrak Kulit Pisang Kepok

Serbuk kering kulit pisang kepok ditimbang sebanyak 500 gram, kemudian dimaserasi dengan 2 liter etanol 70%. Maserasi dilakukan sampai semua senyawa tertarik sempurna (2-3 hari), terlindung dari sinar matahari langsung, dan berada pada suhu ruang, dengan beberapa kali pengadukan. Proses maserasi selesai setelah 3 hari, kemudian disaring dengan kapas, dianggap sebagai penyaringan tahap satu. Penyaringan tahap kedua, disaring menggunakan kertas saring (kertas wattman no.52), sehingga diperoleh maserat dan ditampung dalam wadah penampungan yang tertutup dan terhindar dari cahaya matahari langsung. Maserasi dilakukan sampai warna maserat yang diperoleh jernih atau mendekati jernih. Seluruh maserat yang diperoleh dipekatkan dengan vacuum rotary evaporator pada suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak kental etanol 70% (Noorhamdani, 2012) . Ekstrak yang didapat kemudian dihitung rendemennya dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak Total} = \frac{\text{Bobot Ekstrak yang diperoleh}}{\text{Bobot Simplisia Serbuk}} \times 100\%$$

3.5.5 Uji Fitokimia Ekstrak kulit pisang kepok

Pemeriksaan kandungan kimia/penapisan fitokimia dilakukan pada serbuk dan ekstrak kulit pisang kepok meliputi pemeriksaan

- a. Alkaloid Sebanyak 0,5 g serbuk dan ekstrak ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml aquadest lalu dipanaskan \pm 2 menit lalu didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 tabung. Tabung pertama diberikan pereaksi Bouchardat, akan terbentuk endapan coklat sampai hitam. Tabung kedua diberikan pereaksi Dragendorff, akan terbentuk endapan merah atau jingga. Tabung ketiga diberikan pereaksi Mayer, akan terbentuk endapan putih atau kuning. Alkaloid positif jika terjadi endapan atau kekeruhan paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas (Gholib, 2009).
- b. Flavonoid Sebanyak 5 ml serbuk dan ekstrak ditambah logam Mg sebanyak 0,5 mg, kemudian ditetesi dengan HCl pekat dan 1 mL amil alkohol. Campuran tersebut dihomogenkan. Sampel yang positif mengandung flavonoid akan ditunjukkan dengan adanya warna merah atau kuning pada lapisan amil alcohol (Harbone, 1987).
- c. Saponin Sebanyak 0,5 g serbuk dan sampel ditambahkan 10 ml air panas, lalu didinginkan dan dikocok hingga terbentuk buih dan didiamkan selama 2 menit. Kemudian ditambahkan 1 tetes HCl 2N lalu kocok kembali hingga terbentuk buih yang stabil selama \pm 10 menit (Harbone, 1987).
- d. Tanin Sebanyak 1 g serbuk dan ekstrak ditambahkan 10 ml aquadest lalu panaskan selama 15 menit, filtrat disaring dan didinginkan lalu ditambahkan FeCl₃ 1% beberapa tetes, hasil positif ditandai dengan terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman (Gholib, 2009).

e. Triterpenoid dan Steroid Sejumlah 1 g serbuk dan ekstrak dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam (dalam wadah tertutup rapat) kemudian disaring dan diambil filtratnya, 5 ml 25 dari filtrat tersebut diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu, ke dalam residu tersebut ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 2 ml kloroform pindahkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman Buchard) melalui dinding tabung dilihat lapisan cincin yang terbentuk. Terbentuk warna merah menunjukkan adanya kandungan triterpenoid, sedangkan bila terbentuk warna hijau menunjukkan adanya senyawa steroid (Gholib, 2009).

3.5.6 Sterilisasi Alat dan Media

Peralatan yang digunakan dalam percobaan disterilisasi terlebih dahulu. Peralatan seperti cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, pipet, spatel dan alat gelas lainnya disterilisasi dalam oven pada suhu 160°C selama 3 jam. Untuk media perbenihan dan pipet volume disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.7 Pembuatan Media

Media Mueller Hinton Agar (MHA) dibuat untuk perbanyakan bakteri uji dan pengujian antibakteri. Sebanyak 38 g Mueller Hinton Agar kemudian dilarutkan dalam 1 liter aquadest dan dipanaskan hingga mendidih. Kemudian disterilisasi pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Media uji dibuat

dengan memasukan media MHA masing masing sebanyak 15 – 20 ml kedalam cawan petri. Media perbanyak bakteri dibuat dengan memasukkan media MHA sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi dan diletakkan dalam kondisi miring.

3.5.8 Peremajaan dan Pembuatan Kultur kerja

Peremajaan bakteri digunakan dengan menggunakan media agar MHA miring. Seluruh isolat bakteri diambil dengan menggunakan ose steril selanjutnya digoreskan pada media agar miring dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C untuk bakteri.

3.5.9 Pewarnaan Bakteri

Uji Bakteri uji dilakukan pewarnaan menggunakan pewarnaan Gram bakteri. Sebanyak 1 ose bakteri digoreskan di atas kaca objek, ditetesi dengan 2-3 tetes NaCl 0,9%, diratakan menggunakan ose, kaca objek kemudian difiksasi di atas api bunsen hingga mengering kemudian ditetesi 1-2 tetes kristal violet kemudian didiamkan 1 menit, dibilas dengan aquadest, ditetesi kembali dengan lugol iodine, didiamkan selama 1 menit, dibilas kembali dengan aquadest, ditetesi 1-2 tetes alkohol 96%, didiamkan selama 15 detik, dibilas kembali dengan aquadest, kemudian ditetesi dengan safranin 1-2 tetes didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan aquadest dan dikeringkan. Kemudian ditambahkan minyak imersi dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

3.5.10 Pembuatan Larutan MC Farland

Standar Mc farland 0,5, dibuat dengan cara mencampur 9,95 ml H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml BaCl₂ 1% hingga menjadi keruh. Mc farland kemudian diukur absorbansinya dan setarakan dengan nilai absorbansi pada Mc farland menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 600-625 nm (Doem, 1988)

3.5.11 Pembuatan Suspensi Uji Bakteri

Biakan bakteri yang telah dilakukan peremajaan diambil sebanyak 1-2 ose dan diencerkan ke dalam larutan NaCl 0,9%, kemudian suspensi tersebut kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex, kemudian di inkubasi. Kekeruhan dilihat dengan membandingkan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 (setara dengan 3×10^8 CFU/ml) (Raihara, 2010).

3.5.12 Pelaksanaan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70 % Kulit

Pisang Kepok

Uji daya antibakteri pada bahan uji dilakukan dengan metode difusi cakram, dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- A. Penyiapan larutan uji Ekstrak etanol 70% kulit pisang kepok diencerkan dengan konsentrasi 10%, 15%, 20% menggunakan aquadest.
- B. Sebanyak 100 μ l suspensi bakteri uji disebar ke dalam media agar MHA, kemudian cakram yang berisi 20 μ l larutan uji serta cakram untuk kontrol positif yaitu Mediclin gel dan cakram untuk kontrol

negatif aquadest diletakkan di atas permukaan media yang sudah diinokulasi bakteri dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian diukur diameter zona bening yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

3.5.13 Formulasi Sediaan *Facial Wash Gel*

Formulasi Sediaan *Facial Wash Gel* dengan penambahan ekstrak etanol 70% pisang kapok kuning dengan konsentrasi menurut (Rudiyat, 2020) sebagai berikut :

Tabel 3. 2 Formula *Facial Wash Gel* (% b/b) (Farhamzah, 2020)

Bahan	Konsentrasi				Fungsi
	F0	F10	F20	F30	
Ekstrak etanol 70% pisang kapok	0%	10%	20%	30%	Zat aktif
EDTA-4Na	0.1	0.1	0.1	0.1	<i>Chelating Agent</i>
Carbopol	1	1	1	1	<i>Gelling Agent</i>
Gliserin	2	2	2	2	<i>Humektan</i>
Sodium lauril	2.5	2.5	2.5	2.5	Sulfaktan (Basis)
Propylen glycol	1	1	1	1	Pelarut Pengawet
Nipagin	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet
TEA	3	3	3	3	<i>Alkalizing Agent</i>
Asam Sitrat	0,3	0,3	0,3	0,3	<i>Buffering Agent</i>
Parfum Pisang	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengaroma
Aquadest ad	100	100	100	100	Basis

Modifikasi formulasi *facial wash* gel Masing-masing bahan yang akan digunakan, ditimbang carbopol ditaburkan ke dalam aqua selama 1 hari. Aquadestilata, nipagin, EDTA-4Na glycerine dan propylene glycol di homogenkan dengan magnetic stirrer lalu tambahkan SLS, panaskan larutan hingga suhu 400C, tambahkan propylen glycol, parfum, asam sitrat, ekstrak kulit pisang kepok, scrub beras merah sedikit demi sedikit sampai homogen, tambahkan carbopol dan TEA sampai homogen.

3.5.14 Evaluasi Formula

Evaluasi formula meliputi evaluasi fisik, kimia dan uji aktivitas antibakteri. Evaluasi meliputi pemeriksaan organoleptik, daya sebar, viskositas, uji pH, homogenitas, dan tingkat busa uji aktivitas antibaktri terhadap *Propionibacterium acnes*.

1. Organoleptik

Evaluasi organoleptik termasuk bentuk, warna, dan bau dianalisis secara manual, dengan bantuan mata dan hidung (Sowmya KV, 2015). Organoleptis suatu produk harus sangat diperhatikan karena organoleptis produk dapat memengaruhi minat konsumen.

- a) Bentuk : *Facial wash* gel harus terdapat dalam bentuk cair atau lunak.
- b) Bau : Bau *facial wash* gel harus sesuai dengan *fragrance* yang ditambahkan.

c) Warna : Warna *facial wash* gel dapat diatur dengan zat pewarna sesuai keinginan produsen.

2. Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan dengan cara sediaan gel ditimbang sebanyak 0,5 gram, setelah itu diletakkan gel tepat di bawah kaca bulat yang di bawahnya disertai dengan skala diameter, kemudian ditutup kaca lain yang telah ditimbang dan dibiarkan selama satu menit, setelah itu diukur diameter sebar. Setelah 1 menit, ditambahkan beban 50 gram dan dibiarkan 1 menit, kemudian diukur diameter sebar. Hal yang sama dilakukan tiap 1 menit dengan penambahan beban 50 gram hingga diperoleh diameter yang cukup untuk melihat pengaruh beban terhadap diameter sebar sediaan gel. Daya sebar yang memenuhi syarat yaitu 5-7 cm (Yusuf, 2017).
Pengujian daya sebar dilakukan untuk mengetahui kemampuan kecepatan penyebaran *facial wash* gel pada kulit saat dioleskan pada kulit.

3. Viskositas

Menurut Shmitt (1996) dalam Nurhadi (2012), viskositas merupakan salah satu parameter penting yang menunjukkan stabilitas produk baik produk kosmetik maupun *toiletries* selama distribusi produk. Viskositas adalah tahanan dari suatu cairan untuk mengalir, semakin besar viskositas akan semakin besar pula tahanan alirnya. Adanya viskositas yang tinggi dalam sediaan akan mengurangi frekuensi

tumbukan antarpartikel sehingga sediaan menjadi lebih stabil. Disamping itu, temperatur dapat memengaruhi viskositas, semakin tinggi temperatur akan menyebabkan viskositas menurun (Shinko, 2011).

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viscometer Brookfield LVd2T. Cara pengujian yaitu sediaan gel *facial wash* dimasukkan ke dalam wadah berupa gelas piala 200 ml, spindel no.3 diturunkan hingga batas spindel tercelup ke dalam sediaan, kemudian Atur kecepatan hingga diperoleh torsi 50%-100% kemudian lakukan pembacaan dan catat hasil yang didapat. Persyaratan viskositas untuk sediaan *facial wash* gel yaitu 500-2000cps. (Utami, 2019)

4. Uji pH

Nilai pH suatu bahan dapat memengaruhi daya absorpsi bahan tersebut melalui kulit yang dapat mengakibatkan iritasi kulit ataupun membuat kulit kering. Sabun dengan pH yang terlalu asam dapat mengiritasi kulit karena daya absorpsi bahan melalui kulit meningkat, sedangkan sabun dengan pH yang terlalu basa dapat membuat kulit kering (Melisa, 2019) Nilai pH juga merupakan indikator daya busa suatu sabun.

Pengukuran pH dilakukan dengan cara mencelupkan pH meter pada sediaan. kemudian diamati angka yang terdapat pada monitor pH

meter. Nilai pH sediaan yang memenuhi kriteria pH kulit dan tidak mengiritasi yaitu pH 4,5-6,5. (Nikam, 2017)

5. Homogenitas

Uji homogenitas merupakan salah satu uji yang penting dalam melakukan formulasi sediaan farmasetika, tujuannya untuk mengetahui apakah bahan-bahan dalam formulasi tersebut campur merata atau tidak.

Sediaan ditimbang sebanyak 0,1 gram. Kemudian, diletakkan diantara dua kaca object, lalu diperhatikan apakah terdapat partikel kasar atau ketidakhomogenan di bawah cahaya dengan persyaratan tidak terdapat gumpalan dalam sediaan (Depkes, 1989).

6. Tingkat busa

Daya pembusaan suatu sabun merupakan salah satu parameter penting dalam menentukan mutu suatu sabun. Dalam penggunaannya, busa berperan dalam proses pembersihan dan pelimpahan wangi sabun pada kulit (Gromophone (1983)). Daya pembusaan sabun yang meliputi kualitas, kuantitas, dan kecepatan pembentukan busa dinilai dari stabilitas busa yang dibuat dalam skala angka (Piyali et al (1999)).

Kemampuan membentuk busa diukur dengan melarutkan sampel dalam air pada gelas ukur. Jumlah air yang digunakan dicatat dan gelas ukur digoyangkan secara manual menggunakan tangan hingga 10 kali. Kemampuan pembentuk busa dihitung dengan mengukur

tinggi busa dan stabilitas busa diukur dengan menghitung waktu busa mulai hilang (Pu W, 2016). Persyaratan Tingkat busa untuk sediaan *facial wash* gel adalah 1-10ml/menit (Eugresya, 2018)

7. Uji Antibakteri

Sebanyak 20 ml MHA dituang ke dalam cawan petri. Pada media yang telah padat diletakkan cakram kertas ditimbang sebanyak 0,01 gr gel *facial wash*, diletakkan diatas cakram kertas, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 – 48 jam, setelah itu diukur diameter daerah hambatan (zona jernih) pertumbuhan di sekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong.

3.6 Analisi Data

Data-data yang akan diperoleh dari penelitian ini adalah pemeriksaan organoleptik, daya sebar, viskositas, uji pH, homogenitas, dan tingkat busa uji aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*. Penentuan uji aktivitas antibakteri dengan membandingkan 3 formula *facial wash* gel dimana data yang diperoleh diuji ANOVA pada tingkat kepercayaan 95% (α 0,05) dan dilanjutkan dengan Uji Duncan. Data ditampilkan dalam bentuk mean, standar deviasi, tabel, dan grafik.