

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Beberapa bahan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu diantaranya daun *C. fruticosa* yang diperoleh dari daerah Karawang, akuades, ammonia encer, CHCl_3 , Asam Klorida 2N, pereaksi Mayer dan Dragendorff, HCl encer, pereaksi Liberman Buchard, eter, Gelatin 1%, media NA (OXOID), kultur murni bakteri *P. acnes*, NaCl 0,9%, Mc Farland no.0,5, akuades steril, serbuk klindamisin, gliserin, PVP, metilparaben, etanol 70%, asam sulfat pekat, dan kalium dikromat.

3.2 Alat Penelitian

Beberapa alat yang akan digunakan diantaranya yaitu kain hitam, pisau, blender (PHILIPS), ayakan *mesh* 40, wadah penyimpanan simplisia, alat maserator, batang pengaduk, kertas saring, mortar, stamper, tabung reaksi, *rotary evaporator* (EYELA), pipet tetes, *hot plate*, oven, autoklaf, *magnetic stirrer*, cawan petri, jarum ose, *anaerob jar*, jangka sorong (KENMASTER), piknometer (PYREX), pH meter (ISTEX), plastik mika, penggaris, erlenmeyer (PYREX), timbangan analitik, corong, aluminium foil, inkubator (LAB INCUBATOR Digital # IN-601 Gemmyco), mikropipet serta tip 1000 μl dan 100 μl (FisherBrand), gelas piala (IWAKI, BOMEX), gelas ukur (PYREX), alat pelubang berdiameter 7 mm, dan *Laminar Air Flow* (LAF).

3.3 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Tempat kegiatan penelitian yaitu di Laboratorium Bahan Alam serta Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Waktu penelitian dilakukan dari bulan Januari-Mei 2023.

3.4 Prosedur Percobaan

3.4.1 Determinasi Tanaman

Pemeriksaan identitas atau determinasi tumbuhan dilakukan di Materia Medica Batu di Daerah Malang.

3.4.2 Penyiapan Simplisia Daun *C. fruticosa*

Daun dari tanaman *C. fruticosa* di peroleh pada daerah Karawang, yang kemudian di determinasi, kemudian daun yang baru dipetik dipisahkan dari beberapa bahan pengotor. Lalu dicuci menggunakan air bersih yang mengalir, setelah bersih lalu dikeringkan dari air. Daun *C. fruticosa* diiris diambil daunnya saja serta kemudian dibuat kering dengan cara diangin-anginkan atau dikeringkan dengan sinar matahari. Simplisia yang telah kering sebanyak 1 kg dibuat serbuk menggunakan belender dan ayak menggunakan ayakan *mesh 40*. Simpan serbuk dalam tempat kering dan tertutup rapat pada ruangan yang tidak terkena cahaya matahari.

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *C. fruticosa*

Serbuk simplisia daun *C. fruticosa* (1 : 7,5) yaitu 500 gram direndam menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 3,750 mL, lalu dimaserasi selama 3x24 jam atau 3 hari serta sesekali diaduk. Sesudah didiamkan, dilakukan penyaringan dan ditampung filtratnya. Filtrat yang dihasilkan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C. Filtrat selanjutnya dipekatkan kembali (Utami, 2021).

3.4.4 Skrining Fitokimia

1) Identifikasi Alkaloid

Ekstrak etanol daun *C. fruticosa* ditambahkan ammonia encer ke dalam mortir lalu digerus, dengan menambahkan beberapa mL kloroform dan digerus secara terus menerus. Setelah itu filtrat disaring dan dikocok dengan asam klorida 2N. Kemudian pisahkan lapisan asam lalu bagi jadi tiga bagian di dalam tabung reaksi, tabung reaksi I blanko, tabung reaksi II pereaksi *Mayer* apabila terbentuk endapan putih dinyatakan positif Alkaloid, serta tabung

reaksi III dengan menambahkan pereaksi *Dragendorff*, apabila ada endapan jingga dinyatakan positif Alkaloid (Abriyani *et al.*, 2021).

2) Identifikasi Flavanoid

Ekstrak etanol daun *C. fruticosa* di didihkan dengan 100 mL air panas sekitar 5 menit, dan lalu disaring. Selanjutnya menambahkan serbuk Mg dan 0,5 mL HCl pada 5 mL filtrat, lalu kocok dengan kuat. Terbentuknya warna merah/jingga/kuning menandakan positif Flavonoid (Abriyani *et al.*, 2021).

3) Identifikasi Tanin

Filtrat dimasukkan pada tabung reaksi diberi Gelatin 1%, terbentuknya warna kuning jernih atau endapan putih menandakan positif tanin (Abriyani *et al.*, 2021) atau dengan penambahan FeCl_3 ditandai dengan warna larutan berubah menjadi biru atau hitam kehijauan (Arlofa, 2015).

4) Identifikasi Saponin

Filtrat dimasukan dalam tabung reaksi lalu dikocok dengan kuat sekitar 10 detik. Terbentuknya busa setinggi 1 cm serta persisten sampai 1 menit dan sesudah ditambahkan 1 tetes HCl encer tidak hilang menandakan positif saponin (Abriyani *et al.*, 2021).

5) Indentifikasi Polifenolat

Filtrat hasil pemanasan dengan akuades dijenuhkan dengan natrium asetat dan diberikan larutan pereaksi FeCl_3 1% terjadinya perubahan jadi biru hitam atau hitam kehijauan menunjukkan positif polifenolat (Abriyani *et al.*, 2021).

3.4.5 Uji Konsentrasi Hambat Minimum

1) Sterilisasi Alat

Alat disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C , tekanan 1,5 atm dan sekitar 15 menit.

2) Pembuatan Nutrient Agar untuk Peremajaan Bakteri

Dilarutkan media Nutrient Agar (NA) 0,56 gram dalam 20 mL akuades kemudian panaskan dan aduk hingga homogen. Sterilkan

media dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1,5 atm dan sekitar 15 menit. Setelah itu, masukkan dalam cawan petri, biarkan media memadat. (Dasopang & Simutuah, 2016).

3) Regenerasi Bakteri

Regenerasi dilakukan dengan cara bakteri diambil menggunakan jarum ose lalu digores di media agar dengan aseptis. Setelah itu, media agar yang sudah ditanamkan bakteri murni dimasukkan dalam *anaerob jar*, kemudian diinkubasi sekitar 48 jam.

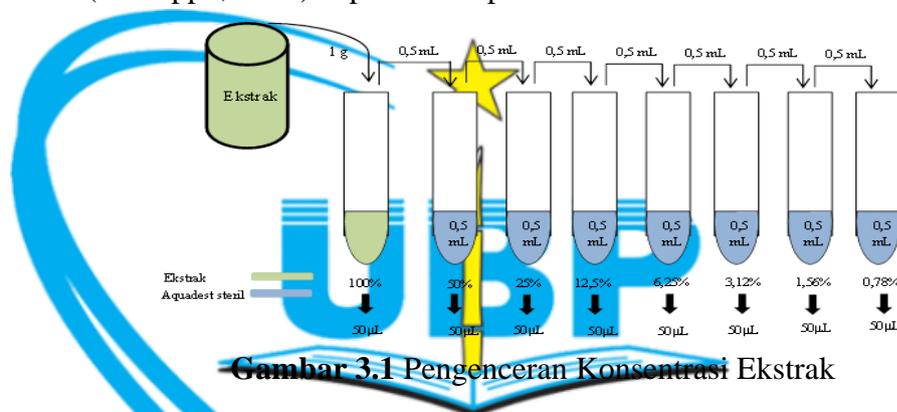
4) Pembuatan Suspensi Bakteri

Cara pembuatan dengan mengambil hasil regenerasi bakteri *P. acnes* dengan menggunakan jarum ose. Bakteri dimasukkan pada tabung yang telah diisi 5 mL larutan NaCl 0,9% steril, serta kekeruhannya dibandingkan dengan *Mc Farland* 0,5 yang setara dengan konsentrasi 1×10^8 CFU/mL. Apabila kurang keruh maka dilakukan penambahan koloni serta apabila terlalu keruh maka ditambahkan NaCl 0,9% (Qamariah *et al.*, 2018).

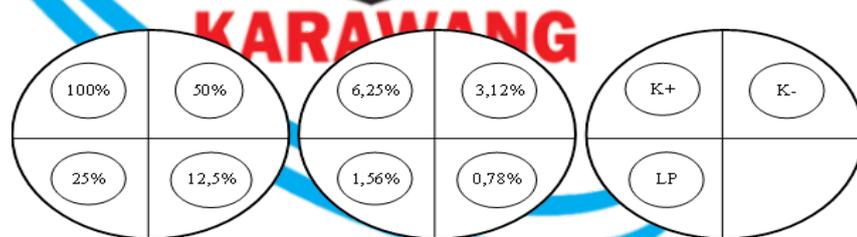
5) Uji Analisis Konsentrasi Hambat Minimum

Metode yang digunakan untuk analisis Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu dengan menggunakan metode difusi sumuran. Pengujian antibakteri ini digunakan pengenceran bakteri *P. acne* dengan konsentrasi 1×10^8 CFU/mL. Sebanyak 20 mL media NA steril dituangkan pada cawan petri lalu tambahkan suspensi bakteri, dan tunggu hingga media memadat. Jika sudah padat kemudian dibuat sumuran 7 mm, tiap cawan petri dibuat sumuran sebanyak 4 lubang sumuran. Ekstrak etanol dari daun *C. fruticosa* ditimbang sesuai konsentrasi yang diteliti yaitu 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12; 1,56%, 0,78%, kemudian dilarutkan dalam ad 1 mL akuades steril yang bisa dilihat pada Gambar 3.1. Masukkan sebanyak 50 µL untuk masing-masing variasi konsentrasi ekstrak kedalam lubang sumuran agar, lalu masukkan dalam *anaerob jar* dan inkubasikan sekitar 48 jam di suhu 37°C. Sesudah inkubasi

dilakukan pengukuran diameter zona hambat dengan mengamati daerah zona bening menggunakan jangka sorong. Kontrol positif yang digunakan adalah serbuk klindamisin, kontrol negatif digunakan akuades steril, serta Larutan Perbandingan (LP) yaitu etanol 70% (Wahyuningsih & Sumaryono, 2021). Pengenceran konsentrasi ekstrak dapat dilihat pada Gambar 3.1 serta pola lubang sumuran pada media agar dapat dilihat pada Gambar 3.2. Adapun klasifikasi baku respon hambatan pertumbuhan bakteri dikutip dari (Manoppo, 2021) dapat dilihat pada Tabel 3.1.



Gambar 3.1 Pengenceran Konsentrasi Ekstrak



Gambar 3.2 Lubang Sumuran Pada Media Agar

Tabel 3.1 Klasifikasi Baku Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri
<5 mm	Lemah atau Tidak Ada
5-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
> 21 mm	Sangat Kuat

3.4.6 Formulasi *Face Mist*

Pembuatan formulasi sediaan *face mist* ekstrak etanol daun *C. fruticosa* mengutip dari penelitian yang dilakukan oleh Apriatsari *et al.*, 2018.

3.4.7 Pembuatan *Face Mist* Ekstrak Etanol Daun *C. fruticosa*

Ekstrak etanol daun *C. fruticosa* ditimbang dengan berbagai konsentrasi, lalu masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam lumpang (ekstrak dilarutkan terlebih dahulu dengan sedikit akuades), lalu masukkan gliserin, serta tambahkan PVP dan metilparaben yang telah dilarutkan dengan air panas, dan gerus hingga homogen, selanjutnya tambahkan akuades ad 100 mL.

3.4.8 Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan *Face Mist*

1) Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1,5 atm dan selama 15 menit.

2) Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri dibuat dengan cara mengambil beberapa ose hasil peremajaan bakteri. Bakteri *P. acnes* ditambahkan dalam 5 mL larutan NaCl 0,9% steril, lalu dilihat kekeruhannya dan disamakan dengan *Mc Farland* 0,5 (Qamariah *et al.*, 2018).

3) Pembuatan Nutrient Agar

Nutrient Agar (NA) dilarutkan dengan akuades lalu panaskan dan aduk memakai magnetik stirer hingga homogen. Media di autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm sekitar 15 menit. Selanjutnya tuangkan pada cawan petri dan tambahkan suspensi bakteri, lalu media didiamkan memadat (Dasopang & Simutuah, 2016).

4) Uji Antibakteri *Face Mist*

Metode yang digunakan untuk uji antibakteri *face mist* menggunakan metode difusi sumuran. Metode ini terdiri dari 3 lubang dan tiap-tiap lubang dimasukkan masing - masing formula sebanyak 50 µL.

Kontrol positif yaitu klindamisin dan kontrol negatifnya yaitu basis, serta LP yaitu metilparaben. Menginkubasi masing - masing cawan sekitar 48 jam pada suhu 37°C. Zona yang dihasilkan diukur diameter daerah beningnya pada masing-masing sampel disekeliling sumuran dengan jangka sorong.

3.4.9 Evaluasi Sediaan *Face Mist*

1. Uji organoleptik

Uji ini merupakan metode pemeriksaan menggunakan pancaindra termasuk pemeriksaan terhadap bau, bentuk, serta warna (Suhartono *et al.*, 2014).

2. Uji pH

Uji pH dengan cara menggunakan pH meter serta harus memenuhi pH kulit yaitu dalam rentang 4,5 – 6,5 (Herliningsih & Anggraini, 2021).

3. Uji Homogenitas

Diambil 5 mL sediaan yang dibuat lalu masukkan dalam tabung reaksi. Terawang di bawah lampu terang dan amati homogenitas campuran bahan-bahan penyusun formula dalam sediaan tersebut. Dikatakan homogen jika sediaan tidak memiliki gumpalan dan endapan dalam larutan (Dewi, 2020).

4. Uji Bobot Jenis

Cara pengujian BJ dengan menimbang piknometer kosong (W1), piknometer + akuades (W2), dan piknometer + ekstrak (W3), kemudian dicatat hasil serta dihitung BJ nya. Bobot jenis yang memenuhi standar harus lebih tinggi bobotnya daripada bobot jenis air sekitar 1 g/mL (Herliningsih & Anggraini, 2021).

5. Uji Daya Sebar Semprot

Pengujian ini dilakukan dengan menyemprotkan sediaan pada plastik mika dari jarak 5 cm dan lalu ukur luas daya sebar nya menggunakan penggaris. Diameter merupakan parameter yang digunakan pada uji

ini. Adapun daya semprot yang bagus yaitu antara 5-7 cm (Hayati *et al.*, 2019).

6. Uji Waktu Kering

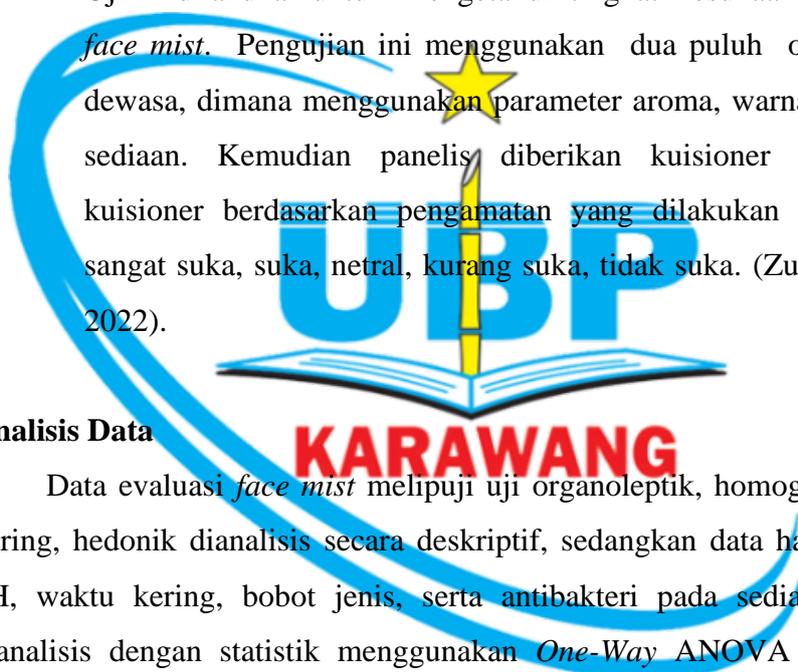
Uji ini dilakukan dengan cara mengaplikasikan sediaan pada sisi dalam lengan bagian bawah. Selanjutnya waktu yang dibutuhkan sampai cairan yang disemprot mengering dihitung. Waktu kering yang bagus yaitu tidak lebih dari 5 menit (Hayati *et al.*, 2019).

7. Uji Hedonik

Uji ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kesukaan dari sediaan *face mist*. Pengujian ini menggunakan dua puluh orang penalis dewasa, dimana menggunakan parameter aroma, warna, tekstur dari sediaan. Kemudian panelis diberikan kuisisioner dan mengisi kuisisioner berdasarkan pengamatan yang dilakukan dengan skala sangat suka, suka, netral, kurang suka, tidak suka. (Zubaydah *et al.*, 2022).

3.5 Analisis Data

Data evaluasi *face mist* meliputi uji organoleptik, homogenitas, waktu kering, hedonik dianalisis secara deskriptif, sedangkan data hasil pengujian pH, waktu kering, bobot jenis, serta antibakteri pada sediaan *face mist* dianalisis dengan statistik menggunakan *One-Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%.



3.6 Diagram Alir Prosedur Penelitian

