

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 ekstrak etanol biji ketumbar (*Coriandrum sativum* L.) yang akan di uji aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes*. Pembuatan formulasi serta pengujian aktivitas antibakteri bertujuan untuk mengetahui efektivitas dari sediaan krim ekstrak etanol biji ketumbar (*Coriandrum sativum* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* yaitu bakteri penyebab jerawat.

3.2 Bahan dan Sampel Penelitian

Bahan dan sampel yang akan diuji yaitu ekstrak etanol 70% biji ketumbar dan bakteri *Propionibacterium acnes*

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak biji ketumbar, etanol 70%, Aquadest Steril, Nutrient Agar, Asam Sulfat (H_2SO_4) pekat, Asam Klorida (HCl), larutan ($FeCl_3$) 1%, NaCl, Asam stearate, Gliserin, TEA (Trietanolamin), metil paraben, Vaseline putih, Propilen Glikol, Cera Alba dan bakteri *Propionibacterium acnes*

3.3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik, oven, belnder, ayakan mesh 40, botol maserasi, *water bath*, *viscometer*, *vacum rotary evaporator*, pH meter, gelas ukur, batang pengaduk, mortir, stamper, *beaker glass*, pipet volum, kain flannel, kertas saring, pipet tetes, aluminium foil, cawan petri, api bunsen, vial, tabung reaksi, mikropipet, ikcubator, kertas coklat, kapas steril.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu 3 konsentrasi ekstrak etanol biji ketumbar (*Coriandrum sativum* L.) yang dibuat sebagai krim anti jerawat untuk wajah dengan variasi konsentrasi ekstrak

2. Variabel Terikat

Variabel terikat meliputi uji efektivitas antibakteri dengan metode Cakram serta evaluasi fisik sediaan krim ekstrak etanol biji ketumbar yang meliputi pengujian organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, dan daya lekat, dan Uji Iritasi

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Berikut adalah tabel definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini, yaitu ditunjukkan pada tabel 3.1 :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1.	Formulasi Krim dari ekstrak etanol biji ketumbar (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	Konsentrasi Ekstrak etanol daun biji ketumbar (<i>Coriandrum sativum</i> L.) yang berbeda beda dan di uji antibakteri	Neraca Analitik	Rasio	Konsentrasi Ekstrak etanol daun biji ketumbar (<i>Coriandrum sativum</i> L.) sebagai antibakteri dalam sediaan

		terhadap <i>Propionibacterium acnes</i>			krim antijerawat
Variabel Terikat					
1.	Uji Organoleptik	Mengevaluasi organoleptik Sediaan Krim ekstrak biji ketumbar (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	Panca Indera	Nominal	1. Warna 2. Aroma 3. Tekstur
2.	pH	Mengevaluasi pH Sediaan Krim ekstrak daun biji ketumbar (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	pH Meter	Rasio	Angka dalam pH meter, pH yang baik yaitu 4,5 – 6,5
3.	Viskositas	Mengevaluasi Viskositas Sediaan Krim ekstrak biji ketumbar (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	Viskometer brokfield cone dengan menggunakan spindle yang sesuai	Rasio	CentiPoise
4.	Daya Sebar	Mengevaluasi Viskositas Sediaan Krim	Penggaris	Rasio	Nilai hasil daya sevar (cm)

		ekstrak biji ketumbar (<i>Coriandrum sativum</i> L.)			
5.	Uji Daya Lekat	Kemampuan sediaan krim ekstrak etanol biji ketumbar (<i>Coriandrum sativum</i> L.) untuk dapat melekat baik pada kulit.		Rasio	Second (S)
6.	Uji Homogenitas	Menempelkan krim pada gelas objek	Kaca Objek	Nominal	Homogen Tidak homogen
7.	Uji Iritasi	Mengoleskan krim pada punggung tangan manusia	Kulit manusia	Nominal	Iritasi Tidak iritasi

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi

Determinasi dilakukan di UPT. Materia Medica Batu Malang. 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).

3.5.2 Pembuatan Ekstrak Biji Ketumbar (*Coriandrum sativum* L.)

Serbuk simplisia biji ketumbar ditimbang sebanyak 2000 gram. Proses ekstraksi maserasi dilakukan dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:7,5. Selanjutnya yaitu memasukkan serbuk simplisia biji ketumbar dalam botol maserasi, lalu menambahkan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 15000 ml hingga terendam dan dilakukan hingga homogen. Serbuk dalam botol maserasi disimpan dalam ruangan yang terlindung dari sinar matahari secara langsung selama 4 hari. Selama perendaman setiap hari dilakukan pengadukan selama 15 menit. Setelah perendaman selama 5 hari, kemudian menyaring ekstrak yang dihasilkan menggunakan kain mori rangkap dua dan dengan kertas saring. Residu yang diperoleh kemudian dilakukan remaserasi dengan jumlah penyari yang sama yaitu 15000 ml. Proses selanjutnya yaitu memekatkan filtrat yang diperoleh dari hasil maserasi dan remaserasi rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak biji ketumbar (Khabibah, 2021)

3.5.3 Skrinning Fitokimia Ekstrak Biji Ketumbar

1. Identifikasi Senyawa Flavonoid

Sampel sebanyak 0,5 gram dicampur dengan 15 mL aquades panas kemudian dikocok, dan disaring. Filtrat yang diperoleh, kemudian ditambah 0,1 g Mg dan 5 tetes HCl pekat. Terbentuk warna kuning, jingga, atau merah (Fikayuniar, 2020)

2. Identifikasi Senyawa Alkaloid

0,5 gr ekstrak dibasakan dengan 10 mL ammonia + 10 mL kloroform digerus menggunakan mortir. Lapisan CHCl_3 dipipet dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan HCl 2%.

Filtrat 1 :+ Pereaksi Mayer, terbentuknya kekeruhan atau endapan putih

Filtrat 2 : + Pereaksi Dragendroff, menunjukkan endapan jingga coklat (Fikayuniar, 2020).

3. Identifikasi Senyawa Tanin

Filtrat hasil pemanasan dengan aquades dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan gelatin 1%, menunjukkan adanya warna kuning jernih (Fikayuniar, 2020).

4. Identifikasi Senyawa Saponin

Sampel diambil sebanyak 0,5 gram ditambah dengan 10 ml aquadestilata panas, didinginkan dan kemudian dikocok selama 10 detik dan ditambahkan HCL 2%. Terbentuknya busa yang stabil (bertahan lama) (Fikayuniar, 2020).

5. Identifikasi Kuinon

Filtrat ditambahkan KOH 5%, Terbentuknya warna jingga hingga merah (Fikayuniar, 2020).

6. Identifikasi Senyawa Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid

0,5 gram ekstrak digerus dengan 12 mL eter, kemudian disaring dan filtrate disimpan dicawan penguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan vanillin 10%. Kemudian terbentuknya warna warna (Fikayuniar, 2020).

3.5.4 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*. Media nutrisi agar yang steril dituang kedalam cawan petri kemudian ditambahkan suspensi bakteri, lalu didiamkan sampai media memadat. Media yang sudah padat tersebut kemudian dimasukkan kertas cakram lalu di inkubasi, Diameter daya hambat diukur dengan melihat area zona bening dengan menggunakan jangka sorong. (Wahyuningsih *et al*, 2021)

Metode yang digunakan dalam analisis KHM sama dengan penentuan uji aktivitas antibakteri, yaitu dengan difusi agar menggunakan metode cakram. 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 dimasukkan kertas cakram lalu di inkubasi. Ekstrak biji ketumbar 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 aquades steril. Ekstrak kemudian dimasukkan pada cawan petri (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 clindamycin dan kontrol negatif menggunakan aquades steril. (Wahyuningsih *et al*, 2021)

3.5.5 Pengujian Aktivitas Antibakteri Sediaan Krim

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 Nutrient Agar

Pembuatan media NA dilakukan dengan Menimbang serbuk sebanyak 0,3gram kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer menambakan aquadestilata sebanyak 15 ml dihomogenkan sampai serbuk agar benar-benar larut. Selanjutnya media agar disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Biarkan temperatur turun sampai 45°C. Media agar siap dituangkan pada plate/ cawan petri (Muhamad, 2014). Cawan petri berdiameter 15 cm dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm dapat menampung media sebanyak 10 ml (Widodo *et al.*,2013).

3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Propionibacterium acnes*

Pembuatan suspensi bakteri yaitu dengan mensuspensikan bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah diinokulasi menggunakan ose steril. Bakteri *Propionibacterium acnes* selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian mengencerkan suspensi bakteri tersebut menggunakan NaCl 0,9% hingga

diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan 0,5 Mc. Farland.

4. Peremajaan Bakteri

Proses peremajaan bakteri dilakukan dengan tujuan melakukan perawatan terhadap bakteri agar tetap dalam kondisi yang baik. Peremajaan bakteri dilakukan menggunakan media agar miring NA, dengan menanam bakteri *Propionibacterium acnes* pada masing-masing media dengan cara menggoreskan menggunakan ose jarum. Media bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37-38°C selama 24 jam (Yusriana et al., 2014).

5. Uji aktivitas antibakteri sediaan krim ekstrak biji ketumbar (*Coriandrum sativum* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*

Metode yang digunakan yaitu metode sumuran. 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 µL 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 (Muljono, et al. 2016). Tiap lubang tersebut diberi sebanyak 0,1 gr sediaan. Perlakuan tersebut dilakukan secara steril di dalam LAF, 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.

6. Pengamatan Pengukuran Diameter Daya Hambat

Pengukuran zona hambat diukur dengan menggunakan mistar berskala/jangka sorong. Kemudian diperoleh berupa diameter (mm) daerah hambatan pertumbuhan mikroba. Untuk mendapatkan hasil yang akurat, tiap daerah hambat dilakukan 3 kali pengukuran dari arah yang berbeda (Mulyatni et al., 2016).

Tabel 3.2 Kategori respon hambatan pertumbuhan bakteri berdasarkan diameter zona hambatan (Mahmudah dan Atun, 2017).

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan
≥ 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
< 5 m	Lemah

3.5.6 Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Biji Ketumbar (*Coriandrum Sativum L.*)

Pembuatan formulasi sediaan krim ekstrak etanol biji ketumbar mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh (Genatrika Erza, 2016.)

Yang ditunjukkan pada tabel 3.3

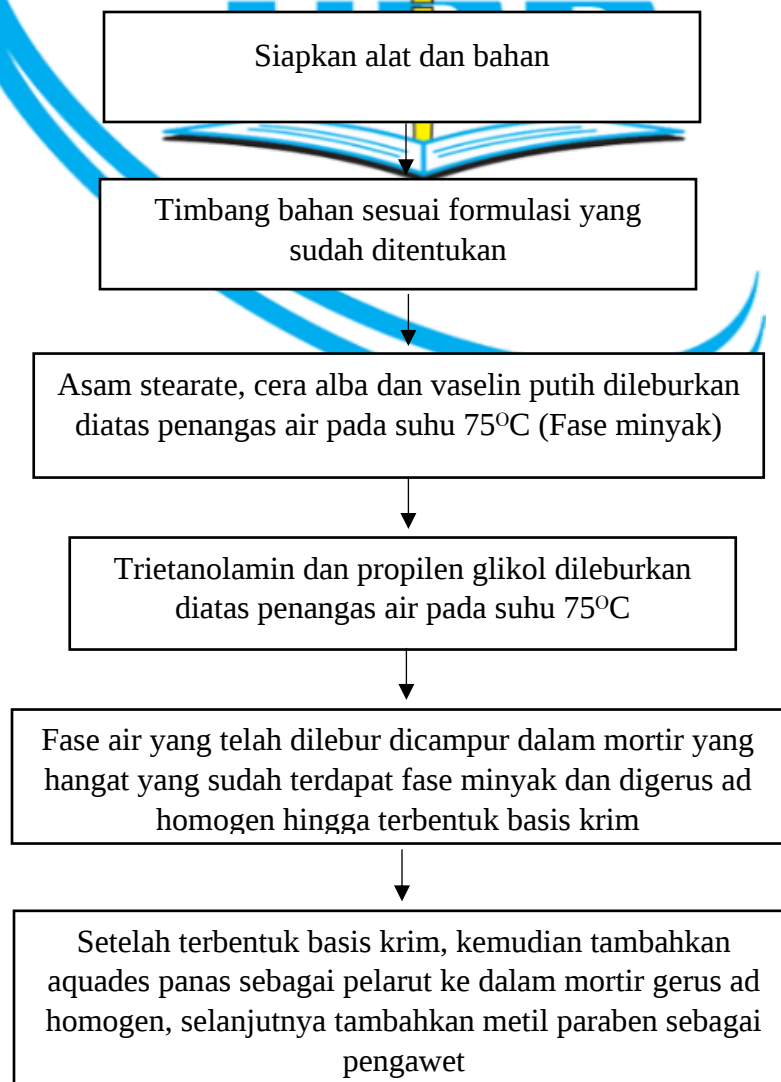
Tabel 3.3 Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Biji Ketumbar (*Coriandrum sativum L.*)

Nama Bahan	Fungsi	Formula			
		F1	F2	F3	Control Control (+) (-)
Ekstrak etanol biji ketumbar		2,5%	5%	10%	Clindamycin
Asam stearate	Pengemulsi	15	15	15	15
Triethanolamine (TEA)	Zat Pengasam	1,5	1,5	1,5	1,5
Cera Alba	Satbilisator Emulsi	2	2	2	2
Vaselin Putih	Basis Krim	8	8	8	8

Metil Paraben	Zat	0,12	0,12	0,12	0,12
	Pengawet				
Propilen Glikol	Humektan	8	8	8	8
Pewangi (Parfum)	Pewangi	5 gtt	5 gtt	5 gtt	5 gtt
Aquadest	Pelarut	Add	Add	Add	Add
		100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

3.5.7 Prosedur Pembuatan Formulasi Krim

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



Setelah krim dingin kemudian tambahkan ekstrak etanol biji ketumbar kedalam basis krim tersebut dan tambahkan 5 tetes pewangi aduk ad homogen

3.5.8 Evaluasi mutu sediaan krim

1. Uji Organoleptik

Pemeriksaan meliputi bentuk, warna, dan bau sediaan, yang dikatakan stabil jika setelah selesai pembuatan.

Bentuk, warna dan bau sediaan krim

Mengamati bentuk, warna dan bau sediaan krim

2. Uji pH

Uji pH bertujuan mengetahui keamanan sediaan krim saat digunakan sehingga tidak mengiritasi kulit. pH sediaan yang baik sesuai dengan pH kulit yaitu berkisar antara 4,5 – 6,5. Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing formula.

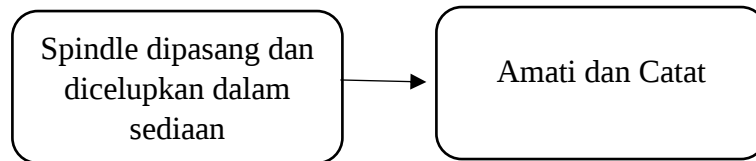
pH meter dicelupkan dalam sediaan

Lihat dan amati

3. 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. Spindle harus terendam dalam sediaan uji. Viskometer lammy dinyalakan dan dipastikan rotor dapat berputar pada kecepatan 60 rpm. Syarat uji viskositas yang baik adalah

2000cp – 50.000cp (Elcistia & Abdul, 2018). Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.



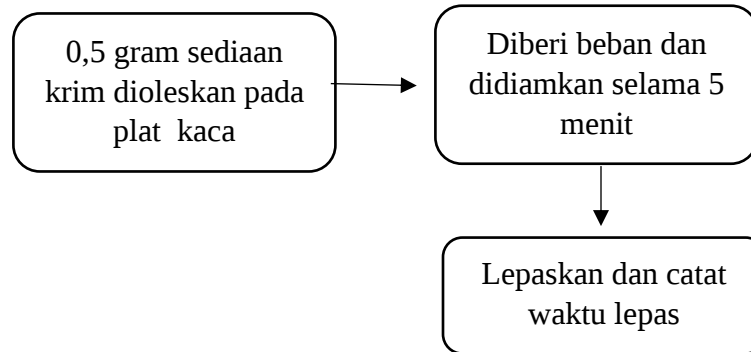
4. Uji Daya Sebar

Uji daya sebar bertujuan untuk mengetahui kemampuan daya sebar krim saat diaplikasikan pada kulit. Timbang 0,5 gr krim ekstrak etanol biji ketumbar, lalu letakkan ditengah cawan petri dengan posisi terbalik, didiamkan selama 1 menit dan diberi beban 50 gram dan 100 gram didiamkan 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)



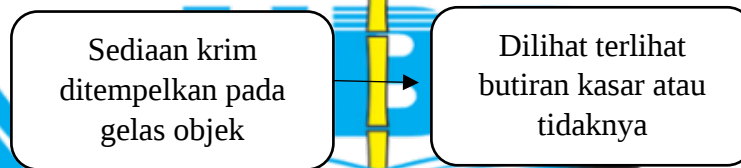
5. Uji Daya Lekat

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).



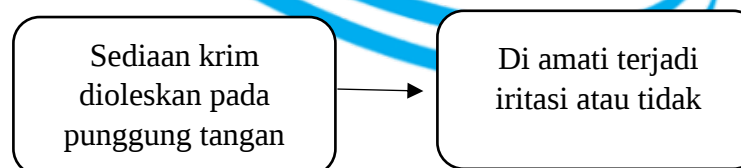
6. Uji Homogenitas

Dilakukan dengan cara mengoleskan krim pada gelas objek dan dilihat secara visual ada tidaknya butiran kasar.



7. Uji Iritasi

Dilakukan dengan cara mengoleskan krim pada punggung lengan bagian kanan. Kemudian di amati pada jam 0, 24, 48, dan 72.



3.6 Analisis Data

Data evaluasi sifat fisik krim meliputi organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat krim dianalisis secara deskriptif, sedangkan data hasil evaluasi krim berupa pengujian aktivitas antibakteri pada sediaan krim dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA

3.7 Diagram Alir Penelitian

Diagram alir dari penelitian ini ditunjukkan oleh gambar 3.1

