

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian ini mencakup tiga jenis perlakuan yang berbeda, yang masing-masing memiliki tiga kali pengulangan, dengan total 9 unit percobaan. Prosedur yang menggunakan konsentrasi ekstrak air daun saga yang berbeda-beda ini bertujuan untuk menghasilkan formulasi dengan kualitas dan aktivitas antibakteri terbaik pada sediaan *patch*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dari bulan Maret hingga Juli 2024.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah daun saga yang didapatkan di Kabupaten Karawang. Sampel yang digunakan yaitu ekstrak daun Saga, yang didapatkan di sekitar Kabupaten Karawang.

3.4 Bahan dan Alat Yang Digunakan

3.4.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun saga (*Abrus precatorius* Linn), aquadest, ammonia encer, CHCl_3 , Asam Klorida 2 N, reagen (Dragendorff dan Mayer), serbuk Mg (spelco), HCl 2% (Smart-lab), amil alkohol, natrium asetat, gelatin 1%, FeCl_3 1% (spelco), NaOH (spelco), pereaksi *liberman buchard*, NaCl 0,9%, Media Nutrient Agar (NA), kultur murni bakteri *Streptococcus mutans*, *Mc Farland* no 0,5, Media *Mueller Hinton Agar* (MHA), Antibiotik Tetrasiklin, *Dimetil Sulfoxide* (DMSO), Alkohol 70%, Polivini alkohol (PVA), Polietilen Glikol (PEG) 400, sukrosa.

3.4.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu cawan petri (ONE LAB), neraca analitik (shimau ATY), mortir dan stamper, autoklaf,

erlenmeyer (PYREX), gelas ukur (PYREX) tabung reaksi (PYREX), rak tabung reaksi, beaker glass (One Lab), corong, alumunium foil, jangka sorong (KENMASTER), inkubator (LAB INCUBATOR Digital # IN-601 Gemmyco), batang pengaduk, bunsen, pinset, mikropipet, *Laminar Air Flow* (LAF), mikropipet serta tip 1000 µl dan 200 µl (*FisherBrand*), alat pelubang berdiameter 4 mm, kawat ose, *freeze dryer*, blender (PHILIPS), spatula, oven (Gemmyco), kaca arloji, pipet tetes, *hot plate*, *magnetic stirrer*, pH meter (ISTEX), penggaris.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu 3,12%, 6,25%, 12,5% konsentrasi ekstrak air daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) yang dibuat formulasi sediaan *patch*.

3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah uji aktivitas antibakteri pada ekstrak air daun saga dan evaluasi fisik sediaan *patch* ekstrak air daun saga yang meliputi pengujian organoleptis, pH, ketebalan, ketahanan lipatan, keseragaman bobot, waktu hancur dan waktu larut.

3.5.3. 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	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas				
1.	Formulasi sediaan <i>patch</i> daun saga (<i>Abrus precatorius</i> Linn.)	Konsentrasi ekstrak air daun saga yang berbeda-beda dan diuji (<i>Abrus precatorius</i> Linn.)	Rasio	Konsentrasi ekstrak air daun saga (<i>Abrus precatorius</i> Linn.) sebagai antibakteri dalam sediaan <i>patch</i> (<i>Streptococcus mutans</i>)

No	Variabel	Definisi	Skala	Hasil Ukur
Variabel Terikat				
1.	Uji Organoleptis	Uji organoleptis ini dilakukan secara visual dengan menggunakan panca indera pada pengujian sediaan <i>patch</i> ekstrak air daun saga	Nominal	1. Bentuk 2. Warna 3. Bau 4. Tekstur
2.	pH	Nilai pH pada sediaan <i>patch</i> ekstrak air daun saga	Nominal	Angka dalam pH meter, pH yang baik 5,6-7.
3.	Ketebalan	Nilai ketebalan pada sediaan <i>patch</i> ekstrak air daun saga	Nominal	Angka yang terlihat pada alat jangka sorong, ketebalan yang baik < 1 mm.
4.	Ketahanan Lipatan	Nilai banyak lipatan pada sediaan <i>patch</i> ekstrak air daun saga	Nominal	Banyaknya jumlah lipatan yang dilakukan hingga patch tersebut robek, ketahanan lipatan yang baik ≤ 200 kali.
5.	Keseragaman Bobot	Menimbang keseragaman bobot pada sediaan <i>patch</i> ekstrak air daun saga	Nominal	Angka yang muncul pada neraca analitik, bobot yang baik $\leq 5\%$
6.	Waktu Hancur dan Waktu Larut	Pengukuran Waktu hancur dan larut pada saat sediaan <i>patch</i> ekstrak air daun saga dimasukkan pada cawan petri yang berisi air	Nominal	Waktu yang menunjukkan pada saat sediaan sudah mulai hancur ataupun larut, range waktu

No	Variabel	Definisi	Skala	Hasil Ukur
		larut dan waktu hancur yang baik yaitu 5-30 detik atau < 60 detik.		

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1. Determinasi

Determinasi ini dilakukan untuk menentukan suatu keaslian dari tanaman saga yang akan diteliti berdasarkan kesesuaian kepustakaan dari ciri-ciri dan morfologi pada tanaman saga. Determinasi tanaman saga ini dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Padjajaran Bandung.

3.6.2. Pembuatan Simplisia Daun Saga (*Abrus precatorius Linn.*)

Daun pada tanaman saga (*Abrus precatorius Linn.*) yang diperoleh di daerah Karawang, yang selanjutnya di lakukan determinasi, lalu daun yang baru dipetik dikumpulkan dan dilakukan sortasi basah untuk memilih bahan baku yang layak dan memisahkannya dari bahan yang tidak memenuhi syarat atau dari kotoran yang ada. Bahan baku dibilas dengan air yang mengalir sampai bersih dan tidak terdapat lagi kotoran. Selanjutnya, bahan baku dikeringkan secara tidak langsung dengan cara diletakkan di atas loyang dan ditutupi kain hitam, dihindarkan dari sinar matahari langsung. Setelah itu, dilakukan sortasi kering untuk memilih bahan baku yang baik dari yang rusak atau terkontaminasi kotoran. Terakhir, bahan baku dihaluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi partikel-partikel kecil.

3.6.3. Pembuatan Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius Linn.*)

Timbang serbuk simplisia daun saga (*Abrus precatorius Linn.*) sebanyak 384 gram kemudian masukkan kedalam beaker glass dan tambahkan aquadest sebanyak 384 ml, lalu tambahkan kembali aquadest dengan jumlah dua kali berat serbuk simplisia tersebut.

Kemudian panaskan hingga 15 menit dihitung pada saat suhu sudah mencapai 90°C dan sembari sesekali diaduk. Setelah itu, infusa dapat di saring saat panas dengan kain flanel. Apabila hasil infusa tidak sama dengan jumlah aquadest awal, maka dapat ditambahkan aquadest pada ampasnya hingga jumlahnya sama. Kemudian hasil infusa yang diperoleh tersebut dimasukkan kedalam cawan petri dan cawan petri tersebut dimasukkan kedalam *deep freezer* untuk dibekukan dengan suhu -50° C selama 2 hari. Setelah 2 hari cawan petri dimasukkan kedalam alat *freeze dryer* untuk proses pengeringan dengan tekanan vakum 0,250 mbar dan suhu *chamber* -50° C dan didiamkan selama 2 hari (2x24 jam).

3.6.4. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dikerjakan agar dapat mengidentifikasi zat yang terdapat dalam tumbuhan, bisa juga dikenal sebagai metabolit sekunder. Metabolit sekunder adalah senyawa yang memiliki peranan krusial dalam keberlangsungan hidup tumbuhan dan memberikan karakteristik unik pada tumbuhan tersebut. Beberapa jenis senyawa yang termasuk dalam kategori metabolit sekunder antara lain alkaloid, tanin, triterpenoid, steroid, polifenolat, kuinon flavonoid, dan saponin (Jannah, 2021).

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 1 gram sampel diolah dengan ammonia. Kemudian, tambahkan 5 ml kloroform dan gerus dengan kuat. Lapisan kloroform yang terbentuk dipipet dan disaring menggunakan pipet yang telah disumbat dengan kapas, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Di dalam tabung reaksi, tambahkan HCl 2N dengan perbandingan 1:10 v/v. Kocok dengan kuat sampai terbentuk dua lapisan, kemudian lapisan asam dipipet dan dibagi menjadi tiga bagian. Filtrat pertama ditambahkan reagen Mayer, dan terbentuknya endapan menunjukkan adanya alkaloid. Filtrat kedua ditambahkan reagen Dragendorff, dan terbentuknya endapan

berwarna jingga atau coklat menandakan hasil positif untuk alkaloid (Fikayuniar, 2022).

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 gram sampel dilarutkan dalam 50 ml air panas, kemudian direbus selama 5 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan sedikit serbuk Magnesium dan 5 ml HCl 2N, kemudian tambahkan amil alkohol. Campuran tersebut dikocok dengan kuat, lalu biarkan hingga terjadi pemisahan. Warna yang terbentuk berkisar antara kuning hingga merah (atau warna tertentu) membuktikan adanya flavonoid (Fikayuniar, 2022).

3. Uji Polifenolat

Sebanyak 50 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan direbus dalam 50 ml air selama 15 menit. Setelah itu, sampel didinginkan dan disaring untuk memperoleh filtrat A. Selanjutnya, ke dalam filtrat tersebut ditambahkan natrium asetat hingga jenuh, diikuti dengan penambahan larutan pereaksi FeCl₃ 1%. Jika terbentuk warna biru hitam atau kehijauan, hal ini membuktikan adanya polifenolat (Fikayuniar, 2022).

4. Uji Tanin

Sebanyak 50 mg sampel dimasukan ke tabung reaksi, lalu di didihkan dalam 50 ml air dengan waktu 15 menit, setelah itu dinginkan dan disaring (Filtrat A). Kemudian kedalam sejumlah filtrat A tambahkan gelatin 1%. Terbentuknya endapan putih membuktikan hasil positif tanin (Fikayuniar, 2022).

5. Uji Saponin

Filtrat A dikocok secara vertikal dalam tabung reaksi selama 10 detik, kemudian ditambahkan HCl 2N. Adanya busa yang bertahan lama setelah penambahan HCl 2N atau setelah didiamkan selama 10 menit membuktikan keberadaan golongan saponin (Fikayuniar, 2022).

6. Uji Kuinon

Sebanyak 50 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan direbus dalam 50 ml air selama 15 menit. Setelah itu, sampel didinginkan dan disaring (Fitrat A). Selanjutnya, tambahkan KOH/NaOH 5% ke dalam tabung reaksi hingga terbentuk warna jingga hingga merah, yang menandakan adanya golongan kuinon (Fikayuniar, 2022)

3.6.5. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

1. Sterilisasi Alat

Alat disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121^0 C, dan tekanan 1,5 atm dengan waktu sekitar 15 menit.

2. Pembuatan Media

Larutkan *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 560 miligram dengan 20 ml aquadest menggunakan erlenmeyer lalu panaskan dan aduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Tutup mulut tabung dengan menggunakan kapas. Lalu sterilkan media agar menggunakan autoklaf pada suhu 121^0 C, dan tekanan 1,5 atm dengan waktu 15 menit. Setelah itu, masukkan media kedalam cawan petri, biarkan sampai media padat.

3. Peremajaan Bakteri

Pada penelitian ini bakteri uji yang digunakan yaitu *Streptococcus mutans*. Kultur murni yang telah disiapkan, kemudian ambil 1 atau 2 ose bakteri murni dan tanam pada media *nutrient agar* yang telah memadat dengan cara digoreskan. Lalu inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Anggraeni & Triajie, 2021).

4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Siapkan tabung reaksi yang telah disterilkan sebelumnya, kemudian masukkan 10 ml NaCl 0,9% pada tabung reaksi. Lalu ambil 1 ose bakteri dari peremajaan bakteri yang telah dibuat, selanjutnya masukkan dalam tabung reaksi yang sudah diberi NaCl

0,9%. Setelah suspensi bakteri jadi setarakan dengan larutan *Mc. Farland* 0,5 agar kekeruhannya setara dengan 10^{-8} CFU/ml (Rizki *et al.*, 2021).

5. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Air Daun Saga (*Abrus precatorius* Linn.)

Metode yang dilakukan untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM) ini yaitu metode difusi sumuran. Uji antibakteri dilakukan dengan mengencerkan bakteri *Streptococcus mutans* pada konsentrasi 10^{-8} CFU/ml. Sebanyak 20 mL Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dituang pada cawan petri, kemudian ditambahkan suspensi bakteri, dan dibiarkan hingga media tersebut memadat. Setelah media memadat, buat lubang sumuran dengan diameter 4 mm, di mana setiap cawan memiliki empat lubang sumuran. Ekstrak air daun saga ditimbang sesuai dengan konsentrasi yang akan diuji yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, dan 0,78%. Selanjutnya, ekstrak tersebut dilarutkan pada masing-masing konsentrasi dengan *dimetil sulfoxide* sebanyak 1 ml. Sebanyak 20 μ l dari setiap variasi konsentrasi ekstrak yang sudah disiapkan dimasukkan dalam lubang sumuran pada media agar. Media agar kemudian diinkubasi selama sekitar ± 24 jam pada suhu 37°C. Setelah di inkubasi, ukur diameter zona hambat dengan cermat menggunakan jangka sorong untuk mengamati daerah bening. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini yaitu antibiotik tetrasiiklin, sedangkan kontrol negatif yang digunakan yaitu *dimetil sulfoxide* (DMSO).

3.6.6. Formula Sediaan Patch Ekstrak Air Daun Saga (*Abrus precatorius* Linn.)

Formula sediaan *patch* ekstrak air daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) yang dimodifikasi dituliskan dalam Tabel 3.2 dibawah ini :

Tabel 3. 2 Formula Sediaan Patch Yang Dimodifikasi (Yousefa *et al.*, 2022)

Bahan	Formula			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak Daun Saga	-	-	-	-
Polivinil alkohol (PVA)	5 g	5 g	5 g	5 g
Polietilena glikol (PEG) 400	1 g	1 g	1 g	1 g
Sukrosa	1 g	1 g	1 g	1 g
Aquadest ad	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml

3.6.7. Formulasi Sediaan Patch Ekstrak Air Daun Saga (*Abrus precatorius* Linn.)

Berikut ini merupakan prosedur formulasi sediaan *patch* ekstrak air daun saga (*Abrus precatorius* Linn.).

1. Persiapkan seluruh peralatan dan bahan yang dibutuhkan.
2. Timbang bahan yang akan digunakan.
3. Larutkan 5 gram Polivinil alkohol (PVA) dengan aquadest, lalu aduk dengan *magnetic stirrer* pada kecepatan 500 rpm dan suhu 80°C hingga Polivinil alkohol (PVA) hingga larut.
4. Setelah Polivinil alkohol (PVA) larut, tambahkan 1 gram Polietilen glikol (PEG) 400 dan aduk hingga tercampur secara merata.
5. Larutkan 1 gram sukrosa dalam 5 mL aquadest hingga benar-benar larut, lalu masukkan ke dalam beaker glass yang berisi Polivinil alkohol (PVA) dan Polietilena glikol (PEG) 400 hingga homogen.
6. Setelah campuran homogen, tambahkan ekstrak air daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) dan aduk hingga merata.
7. Tuangkan campuran yang telah tercampur pada cawan petri dan masukkan ke dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam.
8. Setelah sediaan mengering, keluarkan hidrogel film dari cawan dan potong menjadi bentuk persegi dengan ukuran 2 x 1 cm. (Yousefa *et al.*, 2022).

3.6.8. Evaluasi Fisik Sediaan *Patch* Ekstrak Air Daun Saga (*Abrus precatorius* Linn.)

1. Uji Organoleptis

Uji organoleptis ini dilakukan dengan menggunakan pancha indera dengan memperhatikan bentuk, bau, warna, rasa dan juga tekstur.

2. Uji pH

Uji pH ini dilakukan dengan menggunakan alat pH meter dengan cara sediaan *patch* ukuran 2 cm x 1 cm ditambahkan aquadest sebanyak 10 ml tunggu hingga sediaan larut. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan dengan *patch* yang berbeda (Yousefa *et al.*, 2022).

3. Uji Ketebalan

Uji ketebalan pada sediaan *patch* ini dilakukan dengan cara mengukur ketebalan dari sediaan menggunakan mikrometer sekrup. Pengujian ini dilakukan dengan 3 kali pengulangan, lalu hitung rata-ratanya (Nitiariksa & Iskandar, 2021).

4. Uji Ketahanan Pelipatan

Uji ketahanan pelipatan pada sediaan *patch* dilakukan dengan cara melipat berulang-ulang pada lipatan yang sama hingga sediaan *patch* tersebut mengalami kerusakan atau hingga 200 kali lipatan untuk menhasilkan sifat *patch* yang baik (Nitiariksa & Iskandar, 2021)

5. Uji Keseragaman Bobot

Pengujian keseragaman bobot pada sediaan *patch* ini dilakukan dengan cara menimbang 3 *patch* secara bergantian, kemudian analisis hasil data yang didapat untuk mengetahui rata-rata dan standar deviasinya (Purnamasari & Zulkarnain, 2018).

6. Uji Waktu Hancur dan Waktu Larut

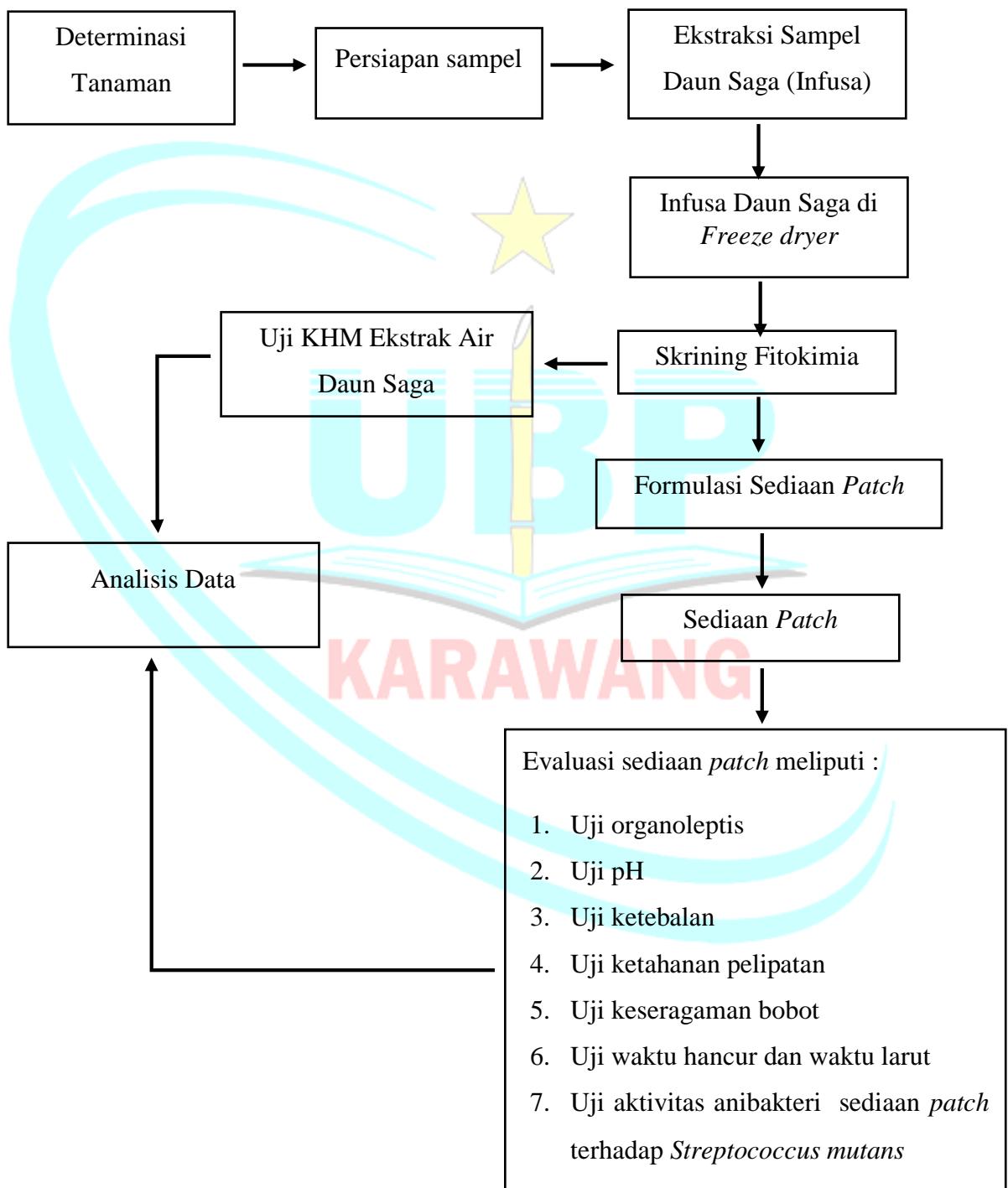
Uji waktu hancur dan waktu larut pada sediaan *patch* dilakukan dengan cara meletakkan sediaan kedalam cawan petri, lalu tambahkan 20 ml aquadest. Kemudian kocok cawan petri samapai *patch* larut. Waktu hancur dapat dilihat pada saat *patch* mulai pecah. Dan untuk waktu larut dapat dilihat pada saat *patch* telah melarut seluruhnya (Yousefa *et al.*, 2022).

7. Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan *Patch* Ekstrak Air Daun Saga (*Abrus precatorius* Linn.)

Uji Aktivitas Sediaan *Patch* Pengujian sediaan *patch* dilakukan dengan metode sumuran yaitu dengan memadatkan media MHA (*Mueller Hinton Agar*) yang telah ditambahkan dengan suspensi bakteri. Dibuat lubang sumuran pada media yang telah memadat dan beri keterangan dengan masing-masing formula. *Patch* yang sudah berisi ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) pada masing – masing formula dipotong dengan ukuran 2 x 1 cm. Larutkan sediaan dengan Dimetil Sulfoksida (DMSO). Masukkan ekstrak ke dalam lubang sumuran sesuai dengan konsentrasi yang tertera. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dan lakukan pengulangan uji aktivitas sediaan *patch* sebanyak 3 kali pengulangan hingga nilai konstan (Saputra *et al.*, 2019).

3.7 Alur Penelitian

Alur penelitian pada uji aktivitas antibakteri formulasi sediaan *patch* pada ekstrak air daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dijelaskan pada Gambar 3.1 dibawah ini



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.8 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh dari hasil uji aktivitas antibakteri sediaan *patch* ekstrak air daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) diolah menggunakan program *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 27. Dengan menggunakan progem ini dilakukan analisis ANOVA (*Analysis Of Varian One Way*). Tujuan dari analisis ANOVA satu arah adalah untuk membandingkan lebih dari dua rata-rata kelompok data. Uji normalitas dan homogenitas diamati karena menjadi syarat uji ANOVA *one way* dengan tingkat kepercayaan 95% dengan tiga kali pengulangan uji antibakteri sediaan *patch* pada masing-masing konsentrasi. Analisis ini bertujuan untuk melihat adanya perbedaan bermakna pada setiap konsentrasi ekstrak. H_0 diterima jika nilai $\text{sig} > 0,05$ artinya masing-masing konsentrasi tidak terdapat perbedaan. Sementara itu H_0 ditolak ketika nilai $\text{sig} < 0,05$ dan menerima H_1 yang artinya terdapat perbedaan nyata. Untuk mengamati perbedaan yang terjadi pada setiap formulasi konsentrasi ekstrak, dilakukan uji *post hoc* LSD.