

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode kuasi-eksperimental dengan tujuan untuk menilai efektivitas gel dari fraksi etil asetat tanaman lidah mertua sebagai agen antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*. Proses penelitian diawali dengan pembuatan formulasi dan dilanjutkan dengan evaluasi fisik sediaan gel. .

3.2 Sampel Penelitian

3.2.1 Sampel Fraksi

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini berupa fraksi dari tanaman lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* Prain). Fraksi tersebut diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) yang berlokasi di Jalan Tentara Pelajar No. 3, Kawasan Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor.

3.2.2 Sampel Bakteri

Penelitian ini menggunakan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan strain ATCC 6919 sebagai mikroorganisme uji. Kultur bakteri diperoleh dari Remel Inc., bagian dari Thermo Fisher Scientific (*Lenexa, Kansas, USA*), dan merupakan produk turunan yang telah mendapatkan lisensi resmi dari *American Type Culture Collection* (ATCC).

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat yang digunakan

Beberapa alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Timbangan analitik (CHQ), wadah maserasi, alumunium foil, batang pengaduk, pH meter (EZODO), sendok tanduk, gelas kimia, lubang sumur, jangka sorong, autoklaf (HIRAYAMA MEG CORP),

inkubator (MEMMERT), laminar air flow, cawan petri (ONEMED), tabung reaksi, pipet tetes, buret (PYREX), gelas kimia (PYREX), bunsen, gelas ukur (BOMEX), lampu spiritus, mikropipet, pinset, tabung jarum ukur, lemari es (AQUOS), kain kasa, Erlenmeyer (PYREX), corong kaca (PYREX), kertas saring, oven (MEMMERT), spuit (ONEMED), petri dish (ONEMED).

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk uji antibakteri mencakup *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919) yang diperoleh dari Remel Inc., USA; media *Nutrient Agar* (NA) dari Himedia ; larutan NaCl 0,9 %, DMSO 1%, kristal violet, iodin, serta Etanol 96% (C₂H₆₀96%). yang semuanya diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Untuk proses penapisan fitokimia, digunakan beberapa reagen, antara lain: etanol 70%, kloroform, amonia, asam sulfat (H₂SO₄), pereaksi Mayer, magnesium (Mg), HCl, dan aquadest, yang semuanya diperoleh dari Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan sediaan gel meliputi: fraksi etil asetat dari daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* Prain) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO), Bogor; serta Carbopol 940, *triethanolamin* (TEA), gliserin, Propilenglikol (C₃H₈O₂), Methylparaben (C₈H₈O₃), propil paraben, dan air suling (aquadest).

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

3.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bahan Alam Sediaan Farmasi, Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.4.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari 2025 sampai Mei 2025.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi etil asetat dari tanaman lidah mertua yang diformulasikan ke dalam bentuk gel. Tiga tingkat konsentrasi yang digunakan yaitu 6,25%, 12,5%, dan 25%, yang pengaruhnya diuji melalui metode difusi sumuran.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat mencakup aktivitas antibakteri dari gel fraksi etil asetat lidah mertua terhadap *Propionibacterium acnes*, yang dianalisis menggunakan metode difusi sumuran. Selain itu, dilakukan pula evaluasi terhadap karakteristik fisik gel seperti pH (menggunakan pH meter), viskositas (dengan viskometer Brookfield), serta uji daya sebar dan daya lekat.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini akan dijelaskan secara rinci melalui tabel definisi variabel yang disajikan pada bagian berikutnya.

Tabel 3. 1 Variabel Terkendali

No	Variabel	Devinisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukuran
Variabel Bebas					
1	Uji Aktivitas Antibakteri Gel Fraksi Etil Asetat	Kosentrasi fraksi etil asetat lidah	Penelitin bakteri dengan	%	Rasio

	Lidah Mertua	mertua	metode	
	(<i>Sansevieria</i>	diperoleh	sumuran	
	<i>trifasciata</i> Prain)	setelah		
	Terhadap	dilakukan		
	<i>Propionibacterium</i>	dengan		
	<i>acnes</i>	metode uji		
		difusi		
		sumuran yang		
		kemudian		
		ditentukan		
		Kosentrasi		
		untuk menjadi		
		bahan aktif		
Variabel Terikat				
1	Skrining Fitokimia	Mengidentifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, tanin, terpenoid yang mengandung fraksi etil asetat lidah mertua	Panca Indra	1. Positif 2. Negatif
2	Uji Organoleptik	Mengevaluasi Organoleptik Sediaan gel	Panca Indara	1. Warna 2. Bau 3. Bentuk pH yang Baik
3	Uji pH	Mengevaluasi pH Sediaan gel	pH Meter	Rasio untuk kulit 4,5-6,5

4	Uji Viskositas	Mengevaluasi kekentalan sedian gel	Alat <i>Viskometer</i>	Rasio	2000 50.000 Cps	–
5	Uji Daya Sebar	Uji daya sebar dilakukan dengan dua lempeng kaca dan diberikan beban	Lempeng kaca dan jangka sorong	Rasio	5-7 cm	
6	Uji daya lekat	Uji daya lekat menggunakan kaca objek dan dihitung waktunya	Objek kaca dan <i>Stopwath</i>	Rasio	Lebih dari 1 detik	

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Identifikasi tanaman merupakan proses membandingkan spesimen tumbuhan yang akan diteliti dengan spesies yang telah diketahui identitasnya, guna memastikan keakuratan identifikasi. Tujuannya adalah untuk menjamin bahwa bahan utama yang digunakan dalam penelitian sesuai dan menghindari kesalahan dalam pengambilan sampel (Diniatik, 2015). Proses identifikasi terhadap tanaman lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* Prain.) dilakukan di UPT Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Padjadjaran, Jawa Barat.

3.6.2 pembuatan Simplisia

Proses pembuatan simplisia dimulai dengan mencuci daun lidah mertua menggunakan air mengalir hingga bersih. Setelah itu, daun ditiriskan, dipotong kecil, dan ditimbang. Daun kemudian dikeringkan hingga mencapai bobot kering, lalu dihancurkan menggunakan blender. Serbuk yang dihasilkan selanjutnya diayak

menggunakan saringan dengan ukuran mesh 200 untuk memperoleh serbuk simplisia halus (Paramastri & Qurrohman, 2022).

3.6.3 Proses Ekstraksi Lidah Mertua

Proses ekstraksi daun lidah mertua dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 1 kg serbuk simplisia kering diekstraksi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut, dengan perbandingan bahan terhadap pelarut sebesar 1:6. Campuran kemudian diaduk dan dibiarkan selama 2 hingga 3 hari. Setelah itu, campuran disaring, dan hasil filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu antara 40–50°C hingga diperoleh ekstrak kental (Peratiwi *et al.*, 2023).

3.6.4 Proses Pembuatan Fraksi Lidah Mertua

1. Fraksi n-Heksan ekstrak lidah mertua

Sebanyak 5 gram ekstrak kental daun lidah mertua dilarutkan dalam 100 mL aquadest, kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan 100 mL n-heksana sebagai pelarut non-polar dalam corong pisah. Lapisan atas (fraksi n-heksana) dan lapisan bawah (air) dipisahkan. Proses ini diulang sebanyak tiga kali (Anggraini, Septriani, & Siska,

2. Fraksinasi etil asetat ekstrak lidah mertua

Residu dari fraksi n-heksana selanjutnya difraksinasi menggunakan 100 mL etil asetat (pelarut semi-polar) dalam corong pisah. Fraksi bagian atas merupakan fraksi etil asetat, sementara bagian bawah merupakan fraksi air. Proses ini juga dilakukan sebanyak tiga kali (Anggraini, Septriani, & Siska, 2021).

3. Fraksinasi air ekstrak lidah mertua

Fraksi air diperoleh dari sisa residu setelah fraksinasi dengan etil asetat. Fraksi air kemudian dikeringkan menggunakan metode *freeze drying* untuk mempercepat penguapan pelarut. Suhu awal

diatur hingga 5°C, kemudian dilakukan pengeringan beku selama 36 hingga 48 jam hingga diperoleh serbuk kering sebagai produk akhir. Pengeringan dianggap selesai ketika wadah tidak lagi terasa dingin saat disentuh (Pratiwi, Saputri, & Ulfa, 2023).

3.6.1 Skrining Fitokimia

Uji kandungan senyawa fitokimia dilakukan dengan metode yang diadaptasi dari penelitian Rihanah dan Jura (2020), dengan prosedur sebagai berikut:

1. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram fraksi dilarutkan dalam 5 mL aquadest, kemudian dipanaskan selama lima menit dan disaring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan dengan 0,1 gram serbuk magnesium serta 1 mL asam klorida pekat, lalu dikocok. Munculnya warna merah, kuning, atau jingga mengindikasikan keberadaan senyawa flavonoid (Nurfirzatulloh, 2024).

2. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 gram fraksi dilarutkan dalam aquadest dan dipanaskan hingga mendidih selama lima menit, lalu disaring. Filtrat hasil penyaringan ditambahkan larutan FeCl₃ 1%. Jika muncul warna biru tua atau hijau kehitaman, maka menunjukkan adanya senyawa polifenol (Azzahrah *et al.*, 2019).

3. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram fraksi etil asetat dilarutkan dalam 10 mL aquadest, lalu dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan 2–3 tetes pereaksi Dragendorff, dan tabung kedua diberi 1 tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan jingga-cokelat (Dragendorff) atau kekeruhan/warna putih (Mayer) menandakan adanya alkaloid dalam sampel.

4. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram fraksi dilarutkan dalam 10 mL aquadest panas ($\pm 70^{\circ}\text{C}$), kemudian dikocok secara intens hingga menghasilkan busa. Setelah didiamkan selama 10 menit, jika terbentuk busa setinggi 1–10 cm, maka hal tersebut menunjukkan adanya senyawa saponin.

5. Uji triterpenoid dan steroid

Untuk mengidentifikasi senyawa triterpenoid dan steroid, fraksi etil asetat ditetesi pereaksi Liebermann-Burchard. Jika warna yang muncul berubah dari ungu ke biru, menunjukkan adanya triterpenoid. Sedangkan perubahan warna dari merah ke hijau menunjukkan keberadaan senyawa steroid (Firdaus, 2022).

3.7 Formulasi

3.7.1 Rancangan Formulasi Gel

Penentuan konsentrasi fraksi etil asetat daun lidah mertua yang digunakan dalam pembuatan gel mengacu pada hasil penelitian Rajebi (2023). Sedangkan komposisi dan metode formulasi gel didasarkan pada metode yang digunakan oleh Rinaldi dan rekan-rekannya (2020), sebagaimana ditampilkan dalam **Tabel 3.2** berikut ini.

Tabel 3. 2 Formulasi Gel Fraksi etil asetat Lidah Mertua

(Rinaldi dkk, 2020).

Bahan	Formulasi (%)b/v				Khasiat
	F0	FI	F2	F3	
Fraksi Etil asetat lidah mertua	0	6,25%	12,5%	25%	Zat aktif
Carbopol 940	1	1	1	1	<i>Gelling agent</i>
TEA (Triethanolamine)	1	1	1	1	<i>Alkalizing agent,</i>

Gliserin	15	15	15	15	<i>Humektan</i>
Metil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	Pengawet
Propil paraben	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet
Propilen Glikol	10	10	10	10	<i>Kosolven</i>
Aquadest	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Pelarut

3.7.1 Prosedur Pembuatan Formulasi Gel

Proses pembuatan gel fraksi etil asetat dari daun lidah mertua dimulai dengan meracik basis gel. Seluruh bahan yang dibutuhkan ditimbang terlebih dahulu. Karbopol 940 dilarutkan dalam sebagian volume aquadest dan diaduk perlahan (disebut W1). Fraksi etil asetat kemudian dicampurkan bersama propilen glikol (W2), lalu dimasukkan ke dalam larutan W1 sambil terus diaduk. Setelah itu, metil paraben dan propil paraben dilarutkan dalam campuran gliserin dan sedikit aquadest hingga larut merata (W3), kemudian ditambahkan ke campuran sebelumnya. Sisa air ditambahkan sedikit demi sedikit sambil digerus hingga campuran homogen. Langkah terakhir adalah penambahan TEA secara bertahap sambil digerus, hingga diperoleh sediaan gel yang stabil (Rinaldi *et al.*, 2020).

3.8 Uji Aktivitas Antibakteri

Evaluasi fisik sediaan gel fraksi etil asetat Lidah Mertua (*Sansevieria trifasciata* Prain.) terdiri dari beberapa pengujian sebagai berikut :

1. Uji Organoleptik

Pengamatan terhadap penampilan fisik gel meliputi warna, konsistensi, dan aroma. Sediaan yang baik memiliki warna hijau kecokelatan, tekstur kental, dan aroma khas dari fraksi lidah mertua (Nurhasnawati *et al.*, 2017).

2. Uji Homogenitas

Tujuan dari uji ini adalah memastikan bahwa gel memiliki campuran yang seragam tanpa adanya butiran kasar. Sampel gel dioleskan pada objek kaca dan diperiksa apakah tampak rata dan halus tanpa partikel yang terlihat (Wasiaturrahmah, 2018).

3. Uji pH

Pengujian ini bertujuan mengetahui tingkat keasaman gel agar aman dan tidak menimbulkan iritasi kulit. Sebanyak 10 gram gel dilarutkan dalam 50 mL aquadest, lalu diencerkan hingga 100 mL. Campuran diaduk hingga homogen dan diukur menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi. Nilai pH yang ideal untuk kulit berkisar antara 4,5–6,5 (Astuti, 2017; Thomas, 2023).

4. Uji Daya Sebar

Untuk menilai seberapa luas gel dapat menyebar di permukaan kulit. Sebanyak 0,5 gram gel diletakkan pada kaca bundar berdiameter 15 cm, ditutup dengan kaca lain, dan didiamkan selama 1 menit. Setelah itu, beban 150 gram ditambahkan selama 1 menit, kemudian diameter sebaran gel diukur. Rentang daya sebar ideal adalah 5–7 cm (Rohmani, 2019; Yusuf, 2017).

5. Uji Daya Lekat

Sebanyak 0,25 gram gel diapit antara dua kaca objek dan diberi beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu, kaca diletakkan pada alat uji dan beban 80 gram dilepas. Waktu hingga kedua kaca terpisah dicatat. Sediaan dianggap memenuhi syarat bila daya lekat lebih dari 1 detik (Hastuty *et al.*, 2018; Fahrezi *et al.*, 2021).

6. Uji Viskositas

Sebanyak 100 mL gel dimasukkan ke dalam tabung viskositas dan dipasang spindle nomor 6. Spindle dicelupkan sepenuhnya ke dalam gel, kemudian *viskometer* dinyalakan pada kecepatan 60 rpm. Nilai viskositas dibaca dari jarum penunjuk dan dikalikan faktor pengali (100). Nilai viskositas ideal untuk gel berada di rentang 2.000–50.000 cPs (Astuti, 2017; Candra, 2022).

7. Uji Stabilitas

Uji stabilitas bertujuan untuk melihat ketahanan fisik gel selama penyimpanan pada kondisi ekstrem. Pengujian dilakukan dengan metode *Cycling Test*, di mana gel disimpan pada suhu rendah (4°C) dan suhu tinggi (40°C) masing-masing selama 24 jam, yang dihitung sebagai satu siklus. Proses ini diulang sebanyak enam kali. Evaluasi dilakukan dengan membandingkan kondisi fisik dan pH sebelum dan sesudah pengujian (Anggun, 2020).

3.9 Uji Aktivitas Antibakteri Gel

3.9.1 Proses Sterilisasi Alat

Sebelum digunakan, semua peralatan laboratorium dicuci hingga bersih dan dikeringkan. Alat seperti pinset, spatula, cawan petri, tabung reaksi, gelas beaker, kaca arloji, dan erlenmeyer dibungkus menggunakan kertas perkamen sebelum proses sterilisasi. Sterilisasi dilakukan menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm (15 psi) selama 15 menit, di mana waktu dihitung setelah suhu dan tekanan autoklaf tercapai secara optimal. Untuk jarum ose, proses sterilisasi dilakukan dengan pijaran langsung di atas api Bunsen. Seluruh prosedur manipulasi dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang telah dibersihkan menggunakan alkohol 70%, baik sebelum maupun sesudah digunakan (Wulandari *et al.*, 2021; Kindangen *et al.*, 2018).

3.9.2 Proses Pembuatan Media

Sebanyak yang dibutuhkan serbuk Nutrient Agar (NA) dilarutkan dalam 100 mL aquadest di dalam erlenmeyer, lalu dipanaskan menggunakan hot plate hingga larut sepenuhnya dan mendidih. Setelah larut, media dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 10–20 mL dan ditutup dengan aluminium foil. Media yang telah disiapkan kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu dibiarkan pada suhu ruang selama sekitar 30 menit hingga mengeras (Andriani, 2017).

3.9.3 Pengembangbiakan Bakteri *Propionibacterium acne*

Bakteri diambil menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah disterilkan dengan cara dipijarkan, kemudian diinokulasikan ke permukaan media. Setelah itu, bakteri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mendukung pertumbuhan koloni (Pertiwi *et al.*, 2017).

3.9.4 Pembuatan Suspensi

Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dibuat dari biakan murni yang telah diinkubasi pada media agar miring selama 24 jam pada suhu 37°C. Sebanyak satu ose biakan diambil dan dimasukkan ke dalam 10 mL larutan NaCl fisiologis 0,9%. Kekeruhan suspensi kemudian disesuaikan dengan standar 0,5 McFarland menggunakan alat *nefelometer* (Mulyani *et al.*, 2021).

3.9.5 Uji Aktivitas Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua Terhadap Bakteri *Propionibacterium acne*

Pengujian dilakukan menggunakan metode difusi sumuran. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri, lalu digunakan untuk menginokulasikan bakteri ke permukaan media NA. Media dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang agar bakteri meresap. Setelah itu, lima sumuran dibuat pada media dengan jarak antar sumur yang sama menggunakan alat boor prop. Masing-masing sumuran diisi dengan: fraksi etil asetat dari lidah mertua dengan konsentrasi 6,25%, 12,5%, dan 25%; gel clindamycin 1% sebagai kontrol positif; serta aquadest sebagai kontrol negatif. Seluruh sampel dimasukkan ke dalam sumuran menggunakan pipet tetes. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, diameter zona hambat (area tanpa pertumbuhan bakteri di sekitar sumur) diukur dalam satuan milimeter (mm). Pengujian dilakukan dalam tiga kali pengulangan untuk validasi hasil (Mulyani *et al.*, 2021).

Kategori Perlakuan pada Uji Difusi Metode Sumuran. Pembagian perlakuan dalam pengujian antibakteri dengan metode difusi sumuran terdiri atas:

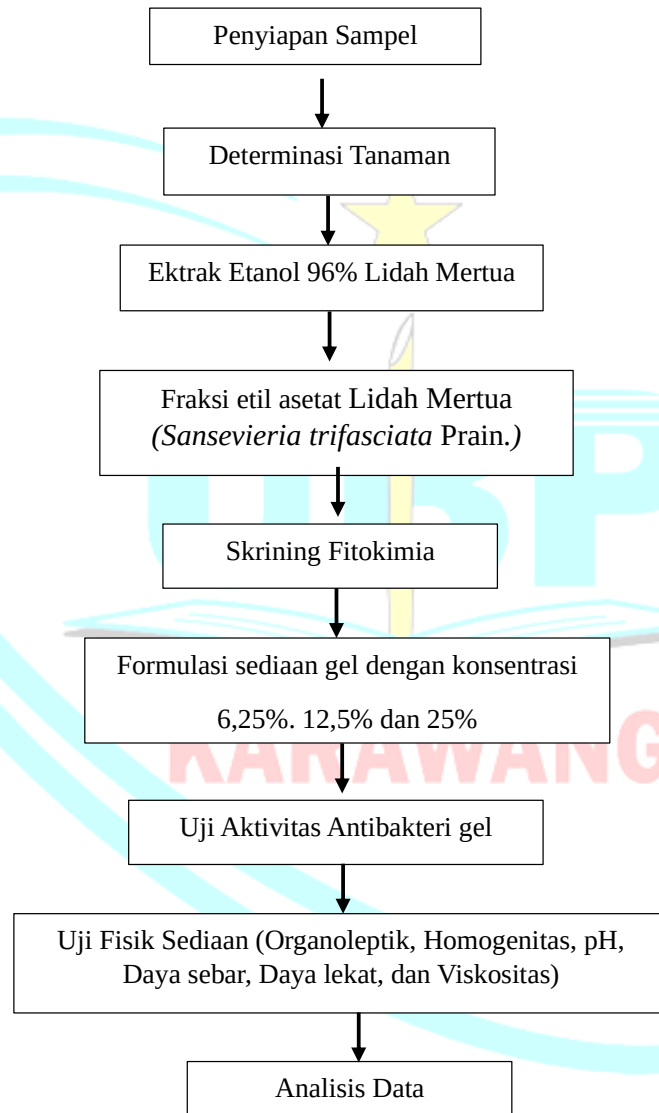
- Kontrol Negatif (-): Kombinasi media, bakteri, dan aquades.
- Kontrol Positif (+): Kombinasi media, bakteri, dan gel clindamycin 1%.
- F1: Kombinasi media, bakteri, dan fraksi etil asetat daun lidah mertua dengan konsentrasi 6,25%.
- F2: Kombinasi media, bakteri, dan fraksi etil asetat daun lidah mertua dengan konsentrasi 12,5%.
- F3: Kombinasi media, bakteri, dan fraksi etil asetat daun lidah mertua dengan konsentrasi 25%.

3.10 Analisis Data

Data hasil evaluasi fisik sediaan, meliputi uji pH, daya sebar, viskositas, serta aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*, dianalisis menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism dengan metode uji *Tukay* untuk melihat signifikansi antar perlakuan.

3.11 Diagram Alir Penelitian

Alur penelitian pada uji antibakteri gel fraksi etil asetat Lidah Mertua (*Sansevieria trifasciata* Prain.) sebagai berikut:



Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian