

### **BAB III**

#### **METODOLOGI PENELITIAN**

##### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret (UNS), Laboratorium Kimia Analis, Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Bahan Alam Universitas An Nuur pada bulan Februari 2023 - Juli 2023. Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Jl Raya Lawu No. 11 Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

##### **B. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan cara pengujian antibakteri sediaan serum ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) terhadap bakteri (*Staphylococcus aureus*). Ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) didapatkan melalui ekstraksi maserasi. Kandungan senyawa kimia didapatkan dari ekstrak kental. Yang kemudian dibuat sediaan serum dengan menggunakan formulasi ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) yang diuji aktivitas antibakteri dengan menggunakan bakteri (*Staphylococcus aureus*).

##### **C. Populasi, Sampel, dan Teknik Sampling**

###### **1. Populasi**

Populasi merupakan keseluruhan jumlah anggota yang berasal dari satu himpunan yang ingin diketahui karakteristiknya berdasarkan inferensi dan generalisasi. Populasi dalam penelitian ini sirih cina (*Peperomia pellucida*).

###### **2. Sampel**

Sampel sirih cina (*Peperomia pellucida*) yang diperoleh dari budidaya di Desa Dalagan Kecamatan Todanan Kabupaten Blora dengan tempat tumbuh pada ketinggian 96-280 meter di atas permukaan laut, dengan suhu bervariasi 23°C-34°C, dengan jenis tanah grumusol.

Saat memilih sampel, peneliti menggunakan tanaman yang homogen sehingga kadar fitokimianya sama. Untuk memilih sampel tanaman sirih cina (*Peperomia pellucida*) mulai dari daun, batang, bunga, biji, dan akar diambil yang berwarna hijau muda, segar yang berumur 2-3 bulan dan tanaman yang tidak diserang oleh hama. Pemilihan sampel yang masih muda dan segar menghindari agar tetap terjaga kandungan fitokimia, karena jika tanaman yang diambil sudah berwarna hijau tua kandungan fitokimia untuk sirih cina (*Peperomia pellucida*) lebih sedikit dibanding tanaman yang masih berwarna hijau muda dan masih segar (Hidayaningtias, 2018).

Pemanenan tanaman sirih cina (*Peperomia pellucida*) dilakukan pada saat tanaman telah tumbuh maksimal dan sudah berumur 2-3 bulan yang dilakukan dengan mencabut tanaman. Tanaman yang berfotosintesis diambil daun dan batangnya saat reaksi fotosintesis sempurna yaitu pukul 08:00-10:30 (Hidayaningtias, 2018).

### **3. Teknik Sampling**

Teknik yang digunakan dalam pengambilan sampel adalah *purposive* sampling merupakan pengambilan anggota sampel dari populasi dengan melakukan kriteria-kriteria pada sampel.

### **D. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama dari penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% sirih cina dari Desa Dalagan yang diperoleh dari ekstraksi metode maserasi sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus*.

#### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

##### **a. Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini ialah formulasi sediaan serum antijerawat ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) dengan berbagai variasi konsentrasi 5%, 10%, dan 15% (Ninsih *et al.*, 2022).

b. Variabel Tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang berdasarkan akibat dari variabel utama. Dalam penelitian ini variabel tergantungnya adalah aktivitas antibakteri sediaan serum ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

c. Variabel Terkendali

Variabel ini merupakan variabel yang diperlukan untuk referensi penelitian selanjutnya sehingga perlunya ditetapkan kualifikasinya agar hasilnya tepat. Variabel terkendali dari penelitian ini adalah metode ekstraksi dan stabilitas sediaan serum.

## E. Definisi Operasional

1. Sirih Cina (*Peperomia pellucida*)

Sampel tanaman sirih cina (*Peperomia pellucida*) diperoleh dari Dukuh Bulumanis Desa Dalagan Kecamatan Todanan Kabupaten Blora. Tanaman dipilih yang homogen sehingga kadar fitokimianya sama. Untuk pemilihan sampel diambil tanaman yang masih hijau segar, dan pengambilan tanaman diwaktu pagi hari.

2. Serbuk

Pembuatan serbuk dengan cara pungumpulan sampel, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering.

3. Pembuatan Ekstrak

Pada penelitian ini untuk pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi. Untuk memperoleh ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) dilakukan penimbangan simplisia sebanyak 1 kg kemudian direndam dengan pelarut sebanyak 10 liter (10.000 ml), setelah itu disaring menggunakan kertas saring, lalu ulangi kembali dengan memberikan pelarut 5000 ml pada maserat tadi. Kentalkan ekstrak menggunakan rotary evaporator.

#### 4. Konsentrasi Sediaan Serum

Konsentrasi sediaan serum ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) dibuat dengan konsentrasi yang berbeda 5%, 10%, dan 15%.

#### 5. Evaluasi Sediaan

Evaluasi sediaan digunakan untuk mengetahui sifat fisik dari suatu sediaan serum ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*).

#### 6. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### 7. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah klindamisin.

Kontrol negatif yang digunakan yaitu formulasi tanpa ekstrak.

#### 8. Uji antibakteri menggunakan metode difusi cakram.

#### 9. Zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dilihat dari yang terdapat di sekitar kertas cakram yang telah di berikan serum ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*). Zona bening dalam uji antibakteri disebut zona yang tidak ditumbuhi bakteri pengukuran zona bening ini dengan jangka sorong.

### F. Alat Dan Bahan

#### 1. Alat

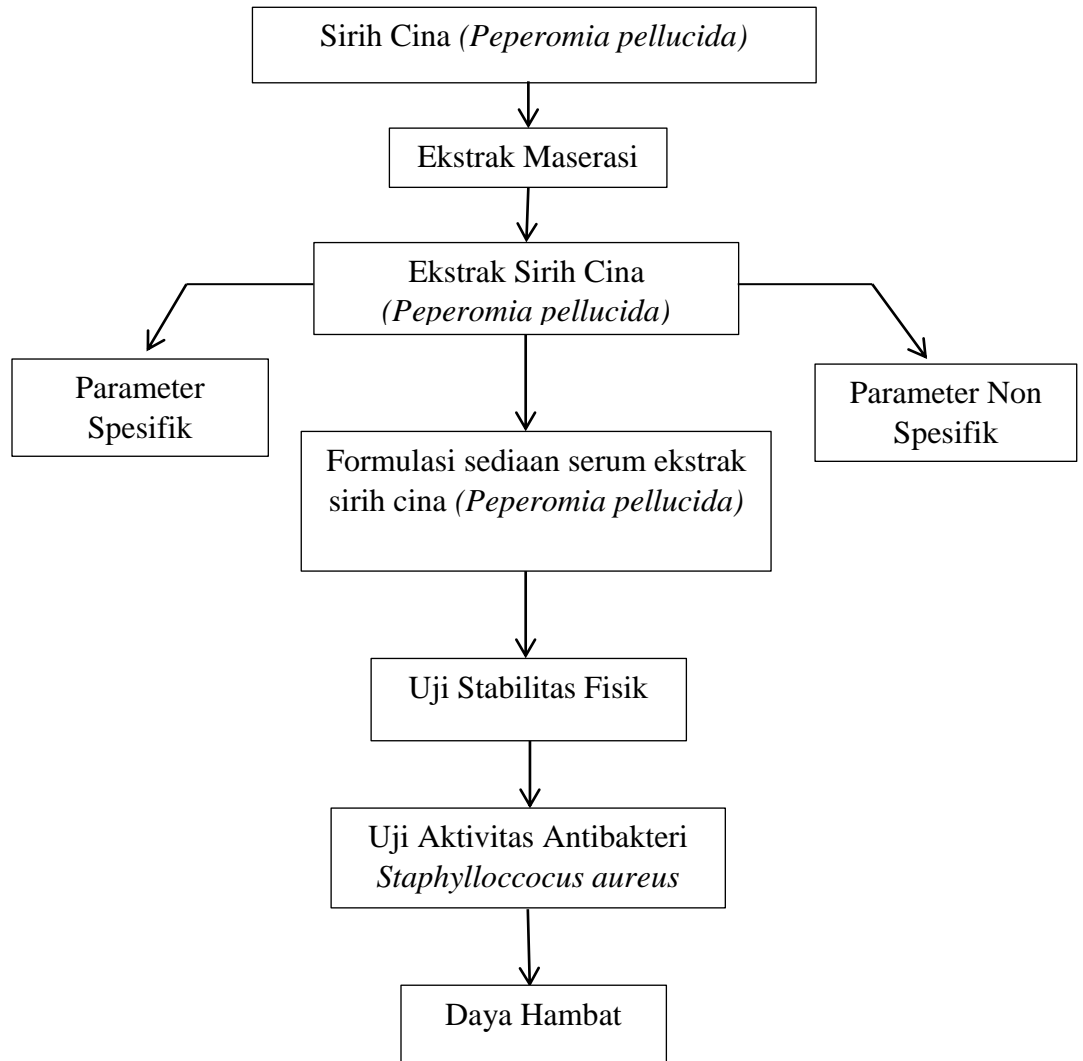
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glass, timbangan analitik, blender, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, autoklaf, erlemeyer, penjepit, pinset, batang pengaduk, spatula, inkubator, bunsen, jarum ose, spuit, kaca arloji, pH meter, botol maserasi, oven, pipet tetes, corong, kertas saring, viskometer, sarung tangan, pinset, cotton bud, kapas, pipet tetes, paper disk, plastic wrap, autoclave, aluminium, rotary evaporator, dan botol serum.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sirih cina (*Peperomia pellucida*), xanthan gum, propilen glikol, metil paraben, trietanolamin (TEA), aquadest, etanol 70%, bakteri *Staphylococcus aureus*, kertas saring (Whatman no. 42), HCl, FeCl<sub>3</sub>, NaCl, Mg, disk klindamisin 10 □ g media Na, aquadest steril, kertas cakram, NaCl

Fisiologis, Kasa steril,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%, reagen mayer, n Butanol, asam asetat, kloroform, aseton, etil asetat, asam stearat methanol, n heksan, kuersetin, piperin, katekin, methanol, asam sulfat,  $\beta$ -sitosterol, pereaksi anisaldehyd, dan pereaksi dragendrof.

### G. Kerangka Konsep



### H. Hipotesis

1. Kandungan senyawa aktif ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) yang mempunyai potensi sebagai antibakteri.
2. Uji stabilitas fisik sediaan serum ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) memiliki stabilitas fisik yang baik.
3. Formulasi sediaan serum ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) yang paling baik menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* adalah konsentrasi formula.

## **I. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi**

Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran bahan yang digunakan pada penelitian. Determinasi dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman dengan referensi dalam literature (Suroso, 2019).

### **2. Pengumpulan dan Pengeringan Bahan.**

Pengumpulan bahan (sampel) ini dimulai dari pengambilan tanaman sirih cina (*Peperomia pellucida*) pada saat pagi hari, saat tanaman mengalami fotosintesis. Tanaman dicabut satu persatu secara acak sebanyak 10 kg, kemudian dilakukan tahapan sortasi basah, tujuannya untuk memisahkan simplisia dari bahan pengotor/kontaminan (tanah, rumput, kerikil, dan serangga) dari sampel yang akan digunakan. Setelah tahapan sortasi basah, dilakukan pencucian simplisia dengan menggunakan air mengalir, kemudian simplisia yang telah dicuci bersih ditiriskan dan diangin-anginkan dalam ruangan kurang lebih 3 hari agar saat perajangan tidak banyak zat-zat yang kontak langsung dengan alat pemotong dan simplisia yang dihasilkan menjadi baik, setelah setengah kering baru dilakukan perajangan (pengecilan ukuran simplisia) agar memudahkan proses pengeringan.

Proses pengeringan dilakukan dengan bantuan cahaya matahari yang tidak kontak langsung dengan tanaman (ditutupi kain hitam agar teduh) yang berlangsung selama 7 hari. Dengan kondisi pengeringan seperti itu, diharapkan kandungan senyawa metabolit sekunder dalam sampel tidak akan rusak (Riris *et al.*, 2020). Pengeringan simplisia bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak selama penyimpanan dengan mengurangi kadar air dan mencegah pembusukan simplisia yang diakibatkan oleh bakteri (Prasetyo *et al.*, 2013).

### 3. Pembuatan Ekstrak Sirih Cina (*Peperomia pellucida*)

Serbuk sirih cina (*Peperomia pellucida*) diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan melakukan penimbangan simplisia sebanyak 1 kg kemudian direndam dengan pelarut sebanyak 10 liter (10.000 ml), kemudian diamkan selama 18 jam pada 6 jam pertama aduk sesekali. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring, lalu ulangi kembali dengan memberikan pelarut 5000 ml pada maserat tadi (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Kemudian ekstrak yang diperoleh dikentalkan dengan rotary evaporator dengan suhu 40°C (Asiyah, 2019).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Bobot awal serbuk simplisia}} \times 100\%$$

Hasil perhitungan rendemen ditunjukkan dengan satuan (%), semakin tinggi nilai rendemen maka nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Kualitas ekstrak yang dihasilkan berbanding terbalik dengan jumlah rendemen yang dihasilkan. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin rendah mutu yang didapatkan (Wijaya *et al.*, 2018).

### 4. Parameter Standar Ekstrak

#### a. Parameter Spesifik

Uji kandungan kimia simplisia ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) bertujuan untuk melihat kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya meliputi uji triterpenoid, saponin, flavonoid, alkaloid, dan tannin.

##### 1) Uji Terpenoid

Sebanyak 2 ml larutan ekstrak ditambahkan dengan pereaksi Liebermann Burchard. Uji positif terpenoid menghasilkan warna merah atau violet (Illing *et al.*, 2017).



## 2) Uji Saponin

Kocok kuat-kuat selama 10 detik 0,5 gram serbuk simplisia dan 10 ml air panas dalam tabung reaksi. Diamati apabila terbentuk buih yang stabil selama < 10 menit, dengan tinggi buih 1-10 cm dan jika ditambahkan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang, maka positif mengandung saponin (Hutahean *et al.*, 2022).

## 3) Uji Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid menggunakan uji Wilstatter. Campurkan 100 ml air panas dan 10 gr serbuk simplisia, dan dididihkan campuran selama 5 menit. Saring dalam keadaan panas, setelah itu diambil 5 ml, dan ditambahkan 0,1 gr serbuk magnesium, 1 ml asam klorida pekat, 2 ml amil alkohol, kocok dan biarkan memisah. Diamati, apabila terjadi perubahan warna menjadi merah, kuning, atau jingga, maka positif mengandung flavonoid (Hutahean *et al.*, 2022).

## 4) Uji Alkaloid

Panaskan 0,5 gr serbuk simplisia yang telah dicampur dengan 1 ml asam klorida 2 N, dan 9 ml aquadest pada waterbath selama 2 menit, tiriskan dan saring. Kemudian masukkan 0,5 ml filtrat ke dalam 3 tabung reaksi, kemudian tetesi dengan pereaksi Wagner, Dragendrof, dan Mayer. Jika terdapat endapan, berarti positif mengandung alkaloid (Hutahean *et al.*, 2022).

## 5) Uji Tanin

Campurkan 0,5 gr sampel yang disari dengan 10 ml aquadest, kemudian saring dan encerkan campuran tersebut hingga tidak berwarna. Sebanyak 2 ml filtrate yang diperoleh, ditambahkan dengan 1-2 pereaksi besi (III) klorida. Positif mengandung tannin apabila berwarna biru atau hijau kehitaman (Hutahean *et al.*, 2022).

#### 6) Uji Kromatografi Lapis Tipis

Siapkan fase diam silica gel GF<sub>254</sub> /plat KLT dengan panjang 6 cm dan lebar 3 cm. Cuci dengan metanol dan diaktivasi dengan oven selama 10 menit pada suhu 105°C. Larutkan ekstrak sebanyak 10 ml dengan 1 ml etanol, kemudian ditotolkan pada fase diam.

##### 1) Identifikasi Senyawa Flavonoid

Fase gerak asam asetat glasialn : butanol : air dengan perbandingan (1:4:5). Penampak noda uap yang digunakan adalah ammonia dengan baku pembanding kuersetin kemudian diamati dengan sinar UV. Reaksi positif menunjukkan terbentuknya noda berwarna kuning coklat, setelah penyemprotan ammonia pada sinar tampak, UV 254 nm dan 366 nm (Sunnah *et al.*, 2019).

##### 2) Identifikasi Senyawa Saponin

Fase gerak yang digunakan adalah klorofom : methanol : air (13:7:2). Penampak noda yang digunakan adalah Lieberman-Buchard. Baku pembanding yang digunakan adalah sapogenin. Apabila terjadi pembentukan warna hijau setelah penyemprotan Lieberman-Buchard maka hasil dinyatakan positif mengandung saponin (Pratama *et al.*, 2013).

##### 3) Identifikasi Senyawa Tanin

Siapkan fase gerak n-butanol : asam stearate : air dengan perbandingan (4:1:5) dengan penampak noda pereaksi FeCl<sub>3</sub> 5%. Baku pembanding yang digunakan adalah katekin. Apabila terbentuk noda berwarna biru kehitaman setelah penyemprotan FeCl<sub>3</sub> 5%, maka dinyatakan positif mengandung tannin (Sopiah *et al.*, 2019).

#### 4) Identifikasi Senyawa Triterpenoid

Siapkan fase gerak n-heksan : etilasetat (4:1) dengan baku pembanding  $\beta$ -sitosterol. Penampak noda anisaldehyd asam sulfat. Hasil positif triterpenoid/steroid apabila timbul warna ungu-merah atau ungu setelah disemprot pereaksi anisaldehyd asam sulfat (Budi *et al.*, 2020).

#### 5) Identifikasi Senyawa Alkaloid

Siapkan fase gerak etil asetat : methanol : air (6:4:2) dengan baku pembanding piperin. Penampak noda pereaksi dagrendroff akan timbul warna coklat atau jingga setelah penyemprotan pereaksi dagrendroff menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak (Devi, 2020).

### b. Parameter Non Spesifik

#### 1) Uji Bebas Etanol

Ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Yuri, 2016).

#### 2) Susut Pengerinan

Menara kurs porselin dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Menimbang ekstrak 2 gr, kemudian ekstrak diratakan dalam kurs porselin dengan menggoyangkan kurs hingga membentuk lapisan setebal 5-10 mm. Masukkan kedalam oven, buka tutupnya dan keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap (Yuri, 2016).

$$\text{Susut Pengerinan} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

#### 3) Bobot Jenis

Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 1% dalam pelarut etanol dalam piknometer. Digunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi

dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang telah di didihkan pada suhu 25°C, suhu diatur hingga ekstrak cair lebih kurang 20°C, lalu dimasukkan dalam piknometer.

Diatur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C kelebihan ekstrak cair dibuang dan ditimbang. Kurangkan bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dan bobot air, dalam piknometer dalam suhu 25°C (Anam, 2013).

#### 4) Kadar Air

Menimbang 3 gr ekstrak dan masukkan kedalam wadah yang telah di tara, kemudian keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang secara seksama. Pengeringan dilanjutkan, kemudian ditimbang lagi pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbang tidak lebih dari 0,25% (Yuri, 2016).

$$\text{Kadar Air} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100\%$$

W : berat (g) dari sampel

W1 : berat (g) dari cawan porselin dari sampel sebelum dipanaskan.

W2 : berat (g) dari cawan porselin dan sampel setelah dipanaskan.

## 5. Pembuatan Sediaan Serum

Pada penelitian ini menggunakan formulasi sebagai berikut:

**Tabel 3.1 Formulasi Bahan (Hasrawati *et al.*, 2020)**

Bahan	K+	K-	Konsentrasi (% b/b)			Kegunaan
			FI	FII	FIII	
Ekstrak sirih cina		-	5%	10%	15%	Zat aktif
Xantham gum		0,5 gr	0,5 gr	0,5 gr	0,5 gr	Basis serum
Propilen glikol	Klindamisin 10 □g/disk	15 gr	15 gr	15 gr	15 gr	Humektan
Metil paraben		0,2 gr	0,2 gr	0,2 gr	0,2 gr	Pengawet
TEA		1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	Alkaling agent
Aquadest ad		100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	Pelarut

Cara pembuatan serum :

Menimbang 0,2 gr xanthan gum yang dikembangkan pada air panas sebanyak 20 kalinya diamkan selama 10 menit sampai mengembang, kemudian digerus hingga terbentuk basis gel (massa A). propilen glikol, metil paraben diaduk dengan magnetic stirrer (500 rpm) hingga homogen (massa B). Selanjutnya campurkan massa B dengan massa A aduk dengan magnetic stirrer (1000 rpm) hingga homogen. Lalu tambahkan ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) sesuai konsentrasi 5%, 10%, 15% yang telah dilarutkan dengan aquadest dan diaduk dengan *magnetik stirrer* hingga homogen, kemudian tambahkan TEA dan aquadest ad 100 ml diaduk dengan *magnetik stirrer* (1000 rpm) hingga homogen dan masukkan kedalam wadah serum (Hasrawati *et al.*, 2022).

## **6. Uji Stabilitas Fisik Sediaan**

### **a. Uji Organoleptis**

Pengujian organoleptis bertujuan untuk mengamati warna, bau dan tekstur pada sediaan serum, uji organoleptis akan berpengaruh terhadap kenyamanan pengguna oleh karena itu sebaiknya sediaan memiliki warna yang menarik. Pengujian organoleptik dilakukan dengan mengamati warna, aroma dan konsistensi sediaan (Damayanti, 2014).

### **b. Uji Homogenitas**

Uji homogenitas dilakukan dengan cara sampel serum dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang cocok, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Hasrawati *et al.*, 2020).

### **c. Uji pH**

Uji pH dilakukan dengan cara mengukur pH serum menggunakan pH meter yang dicelupkan dalam sampel serum sebanyak 0,5 gram yang telah dilarutkan dalam 50 ml aquadest, kemudian diamati hasilnya (Marina, 2015). Nilai pH yang baik untuk kulit yaitu 4,5-6,5 (Naibabo *et al.*, 2013).

### **d. Uji Daya Sebar**

Sampel seberat 0,5 gr diletakkan di atas kaca dan ditunggu selama 1 menit. Diameter sebar sampel diukur. Selanjutnya ditambah 150 gr beban dan didiamkan selama 1 menit lalu diukur diameter yang konstan (Warnida *et al.*, 2016).

### **e. Uji Daya Lekat**

Sediaan seberat 0,5 gr diletakkan di atas objek gelas, kemudian objek gelas yang lain diletakkan diatasnya dan ditekan dengan beban seberat 1 kg selama 5 menit. Selanjutnya objek gelas dipasang pada alat uji. Kemudian beban seberat 80 gr dilepaskan dan dicatat waktunya sehingga kedua objek gelas tersebut terlepas (Dewantari *et al.*, 2015).

#### **f. Uji Viskositas**

Dilakukan pengujian viskositas bertujuan untuk mengetahui kekentalan serum, biasanya faktor-faktor yang mempengaruhi penurunan nilai viskositas yaitu suhu, konsentrasi bahan, dan reaksi kimia yang terjadi saat penyimpanan dipercepat. Pengujian viskositas dilakukan dengan cara memasukkan sediaan serum kedalam wadah lalu dilihat nilai viskositas menggunakan Viscometer Brookfield (Hasrawati *et al.*, 2020). Dengan nilai viskositas pada serum wajah adalah sebesar 800 sampai 3000 dPas (Dewantari *et al.*, 2015).

### **7. Persiapan Media dan Pembuatan Bakteri**

#### **a) Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat yang diperlukan dibersihkan dengan cara dicuci terlebih dahulu sebelum disterilisasi, kemudian dikeringkan dengan posisi terbalik di udara terbuka, setelah kering dibungkus dengan kertas perkamen. Tabung reaksi dan gelas erlenmeyer disumbat dengan kapas bersih. Sterilisasi alat dan bahan dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Narulita, 2017).

#### **b) Pembuatan Media**

Pembuatan media NA dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 20 gr/liter NA. Kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer lalu ditambahkan dengan 250 ml aquades. NA dan aquades dalam labu erlenmeyer dipanaskan dengan menggunakan hotplate selama  $\pm 10$  menit hingga NA larut. Media yang telah homogen disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah itu media ditunggu hingga agak dingin sekitar suhu 40-45°C. Media NA yang telah dingin kemudian nantinya akan dituangkan ke cawan petri sebanyak 10 ml. Media NA yang telah dituang ke dalam cawan petri dibiarkan hingga memadat (Narulita, 2017).

### c) Peremajaan Bakteri

Satu koloni biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dengan menggunakan ose steril dari kultur murninya, dan selanjutnya diinokulasikan dalam medium Nutrien Agar (NA) miring, kemudian diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Nuralifah *et al.*, 2019).

### d) Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Untuk membuat suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu dengan cara biakan *Staphylococcus aureus* diambil dengan kawat ose steril, kemudian disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland (Rahayu, 2019).

## 8. Pembuatan Larutan Kontrol

### a. Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan yaitu klindamisin 10 µg/disk. Klindamisin 10 µg/disk digunakan sebagai kontrol positif karena menggunakan jenis antibiotik yang digunakan untuk mengobati penyakit akibat infeksi anaerob gram positif salah satunya bakteri *Staphylococcus aureus* dan banyak digunakan sebagai antijerawat baik secara oral maupun topikal (Firmansyah, 2022).

### b. Kontrol Negatif

Kontrol negatif adalah kelompok perlakuan yang tidak dapat menghasilkan efek atau memberikan perubahan pada variabel tergantung. Tujuan menggunakan kontrol negatif adalah untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan formulasi tanpa ekstrak yang bertujuan untuk mengetahui formulasi dari ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* (Hasrawati *et al.*, 2020).

## 9. Uji Aktivitas Bakteri

Pengujian aktivitas antibakteri sirih cina (*Peperomia pellucida*) menggunakan metode difusi agar dengan teknik cakram (*paper disk*).



Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 ml dituang secara merata pada medium. Setelah mengering, kertas cakram steril dengan diameter 6 mm diresepsi dengan formulasi tanpa ekstrak sebagai kontrol negatif dan serum ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida*) dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15% sebanyak 10 µl dan klindamisin 10 µg/disk. Diletakkan pada permukaan medium secara aseptis (*cottona bud steril*). Medium perlakuan ini diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah 24 jam akan terbentuk zona bening di sekitar cakram yang menunjukkan kemampuan dari sediaan uji dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Setelah itu dilakukan pengukuran zona hambat dengan menggunakan jangka sorong (Firmansyah, 2020).

#### **10. Daya Hambat**

Uji daya hambat dilakukan dengan pengukuran zona hambat diukur dengan menggunakan mistar berskala/jangka sorong. Kemudian diperoleh berupa diameter (mm) daerah hambatan pertumbuhan mikroba termasuk diameter kertas cakram (Hasrawati *et al.*, 2020).

#### **11. Analisis Data**

Data yang diperoleh dari data penelitian di analisa secara kuantitatif menggunakan software SPSS type 25 dengan taraf kepercayaan 95%. Untuk mengetahui pengaruh stabilitas fisik meliputi uji pH, uji daya sebar, uji daya lekat, uji viskositas, dan pengaruh diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan analisis menggunakan statistic One Way ANOVA. Dilakukan dengan uji *Post Hoc* menggunakan analisis *Tukey test* yaitu untuk melihat perbedaan signifikan antara masing-masing kelompok uji (Firmansyah, 2022).

## J. Kerangka Penelitian

