

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan Laboratorium Farmasi Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret (UNS), Laboratorium Teknologi Farmasi, Laboratorium Kimia Analisis & Laboratorium Bahan Alam Universitas An Nuur pada bulan Februari-Mei 2023. Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT).

B. Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah eksperimental, pada variasi konsentrasi ekstrak daun katuk 40%, 60% dan 80% diformulasikan dalam sediaan serum antijerawat. Kemudian dilakukan pengujian mutu fisik serum yaitu uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat. Uji aktivitas antibakteri serum dilakukan dengan metode difusi kertas cakram dengan pembading klindamisin 10 µg/disk terhadap bakteri *Propionibacterium acne*.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Tanaman daun katuk (*Sauropus androgynus (L) Merr*) didapatkan dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Kecamatan Tawangmangu, Karanganyar.

2. Sampel

Sampel yang digunakan yaitu serum ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus (L) Merr*). Sampel dalam ekstraksi adalah serbuk daun katuk dari B2P2TOOT.

D. Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah segala sesuatu dalam bentuk apapun yang ditetapkan oleh peneliti sebagai hal yang akan digunakan untuk dipelajari

sehingga diperoleh informasi tentang hal tersebut untuk diambil kesimpulannya (Sugiyono, 2017).

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dari penelitian *ini* merupakan ekstrat etanol 70% daun katuk (*Sauvopus androgynus (L) Merr*) dari B2P2TOOT Kecamatan Tawangmangu, Karanganyar dengan metode maserasi dan diformulasikan dalam sediaan serum sebagai antibakteri *Propionibacterium acnes*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

a. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung. Pada penelitian ini variabel bebas yaitu kadar konsentrasi ekstrak etanol daun katuk (*Sauvopus androgynus (L) Merr*) pada formulasi sediaan serum dengan variasi presentase ekstrak 40%, 60% dan 80%.

b. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang berdasarkan akibat dari variabel utama. Pada penelitian ini variabel tergantung yaitu aktivitas antibakteri sediaan serum ekstrak etanol daun katuk (*Sauvopus androgynus (L) Merr*) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang telah ditentukan sedemikian rupa untuk mendukung hasil penelitian. Variabel terkendali dari penelitian yaitu inokulasi bakteri dan sterilisasi alat dan bahan.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Sampel daun katuk (*Sauvopus androgynus (L) Merr*) diperoleh dari B2P2TOOT di kecamatan Tawangmangu, Karanganyar. Untuk sampel yang digunakan yaitu daun tua dan segar.
2. Pembuatan serbuk dengan cara pengumpulan sampel, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering dan penyimpanan. Jika

dibuat serbuk simplisia yang sudah kering dilakukan penghalusan dan diayak dengan ukuran mesh 60.

3. Dalam penelitian ini untuk memperoleh ekstrak daun katuk dilakukan ekstraksi 2000 g simplisia dengan 10 L pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi.
4. Formulasi sediaan serum ekstrak daun katuk dibuat dengan konsentrasi yang berbeda pada ekstrak yaitu 40%, 60% dan 80%.
5. Kontrol positif yang digunakan klindamisin 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ dan kontrol negatif yaitu DMSO.
6. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Propionibacterium acnes*
7. Uji antibakteri menggunakan difusi kertas cakram
8. Zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dilihat dari sekitar kertas cakram yang telah diberikan sediaan serum ekstrak daun katuk. Zona bening dalam uji antibakteri tersebut zona yang tidak ditumbuhinya bakteri, pengukurannya menggunakan jangka sorong.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu oven, botol maserasi, gelas ukur, mortir dan stamper, batang pengaduk, *rotary evaporator*, sudip, timbangan analitik, lemari pendingin, ayakan mesh no. 60, kertas saring, corong, kain mori, objek glass, stik pH, alat uji daya lekat, sarung tangan, jarum ose, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kaki tiga, bunsen, korek api, *hot plate*, pinset, mikropipet, autoklaf, LAF (*Laminar Air Flow*), alat sterilisasi, alat inkubasi, *anaerobic jar*, gas kit, pipet volume, pipet tetes erlenmeyer, beaker glass, kertas cakram steril, kapas, kertas pembungkus, *alumunium foil*, *cottond bud steril*, jangka sorong, alat pengukur susut pengeringan (*moisture balance*), *chamber*, fase diam plat KLT silika GF₂₅₄, pipa kapiler, lampu UV 366 nm dan UV 254 nm.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu serbuk daun katuk (*Sauropus androgynus (L) Merr*), etanol 70%, *xanthan gum*, *Trietanolamin* (TEA), propilenglikol, metil paraben, air suling (aquadest), HCl 2 N, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, serbuk Mg, HCl pekat, asam klorida 2 N, FeCl₃ 1%, asam sulfat H₂SO₄, kalium dikromat (K₂Cr₂O₇), biakan murni bakteri *Propionibacterium acnes*, *Blood Agar Plate* (BAP), medium *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Brain Heart Infusion* (BHI), darah domba steril, larutan standar 0,5 Mc. Farland, magnesium 0,1 mg, klindamisin 10 µg/disk dan NaCl 0,9%, n-butanol, asam asetat, asam stearate, metanol, kloroform, amoniak, *Liebermann-bouchardat*, piperin, katekin, quersetin dan sapogenin, DMSO.

G. Jalan penelitian

1. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun katuk sebanyak 2000 g yang diperoleh dari B2P2TOOT.

2. Determinasi Tanaman

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 literatur. Determinasi daun katuk (*Sauropus androgynus (L) Merr*) pada penelitian ini dilakukan di B2P2TOOT.

3. Uji Susut Pengeringan

Penentuan susut pengeringan ditentukan dengan alat *moisture balance* untuk mengetahui kandungan air dalam simplisia. Sebanyak 2 g sampel dimasukan kedalam piring alummunium foil alat *moisture balance* yang telah disiapkan pada suhu 100°C selama 10 menit. Hasil yang tertera dengan satuan persen dengan kadar yang ditentukan kurang dari 10% (Wiendarlina dkk, 2019).

4. Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi digunakan yaitu maserasi. Sebanyak 2000 g serbuk daun katuk direndam dengan etanol 70% sebanyak 10 L dengan perbandingan 1:5 pada botol gelap selama 5 hari. Pada perendaman setiap hari dilakukan pengadukan sekali sehari. Setelah perendaman selama 5 hari, dilakukan penyaringan dengan kain mori rangkap dua dan kertas saring untuk mendapatkan filtrat, seluruh filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C (Zukhri dkk, 2018).

5. Rendemen Ekstrak

Perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal yaitu rendemen. Rendemen ekstrak daun katuk dihitung dengan membandingkan bobot awal simplisia dengan bobot akhir yang dihasilkan.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak total (g)}}{\text{Bobot simplisia (g)}} \times 100 \%$$

Hasil perhitungan rendemen ditunjukkan dengan satuan (%), semakin tinggi nilai rendemen maka 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 dkk, 2018).

6. Uji Bebas Etanol

Memasukkan sejumlah ekstrak kedalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes asam sulfat pekat (H_2SO_4) dan 1 ml kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Larutan bebas etanol maka akan terbentuk warna campuran dari larutan ekstrak dan larutan kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) yang ditambahkan asam sulfat (H_2SO_4), tetapi jika larutan mengandung etanol maka akan tercium bau khas ester (Ramadhani dkk, 2020).

7. Skrining Fitokimia

Analisis kualitatif pada senyawa metabolit sekunder disebut dengan skrining fitokimi. Ekstrak yang mengandung senyawa metabolit sekunder dapat diidentifikasi dengan pereaksi-pereaksi yang mampu memberikan ciri khas dari setiap golongan dari metabolit sekunder untuk identifikasi senyawa dilakukan dengan cara uji tabung pereaksi dan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Supomo dkk, 2016).

a. Flavonoid

Sebanyak 2 g sampel ditambahkan 20 ml aquadest untuk melarutkan ekstrak daun katuk. Kemudian diambil 4 ml lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat. Bila terbentuk warna kuning, orange/merah menunjukkan adanya flavonoid (Supomo dkk, 2016).

b. Saponin

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 1 menit. Jika terbentuk buih yang banyak selama tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Supomo dkk, 2016).

c. Tanin

Sebanyak 1 g sampel dilarutkan dalam 10 ml air suling kemudian ditambahkan dengan 1-2 tetes FeCl₃ 1%. Adanya warna hijau kehitaman, hijau atau biru kehitaman menandakan adanya tanin (Supomo dkk, 2016).

d. Alkaloid

Ditimbang sebanyak 0,5 g sampel dilarutkan dengan air sebanyak 4 ml dan tambahkan 1ml HCl 2N kemudian masing-masing tabung diberikan pereaksi mayer, wagner dan dragendorff:

- 1) Sampel sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi Meyer akan terbentuk endapan berwarna putih atau kuning.

- 2) Sampel sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi Wagner akan terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam.
- 3) Sampel sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi Dragendorff akan terbentuk endapan berwarna merah atau jingga (Supomo dkk, 2016).

Identifikasi senyawa metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pengujian KLT menggunakan fase diam yaitu plat KLT silika GF₂₅₄ dengan ukuran panjang 6 cm dengan lebar 3 cm, diaktivasi dengan oven 110°C dalam 15 menit. Ditotolkan ekstrak pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler. Fase gerak yang digunakan pada senyawa yang diidentifikasi yaitu:

- a. Identifikasi senyawa golongan flavonoid fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) dengan pereaksi amoniak dan baku pembanding kuersetin. Jika positif maka noda akan warna lembayung gelap, biru muda, kuning, jingga, hijau-kuning, hijau-biru, merah jingga, dan ungu (Devi, 2020).
- b. Identifikasi senyawa golongan saponin fase gerak kloroform : metanol : air (13:7:2) disemprotkan penampak bercak *Liebermann-bouchardat* dan pembanding sapogenin, jika positif mengandung saponin ditandai dengan bercak berwarna hijau dan biru (Sopianti dkk, 2018).
- c. Identifikasi senyawa golongan tanin fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) dengan penampak noda pereaksi FeCl₃ 5% dan baku pembanding katekin. Jika positif menghasilkan warna biru kehitaman (Banu dan Nagarajan, 2014).
- d. Identifikasi senyawa golongan alkaloid fase gerak etil asetat : metanol : air (6:4:2) dengan pereaksi dragendorff dan pembanding piperin. Jika positif maka akan dihasilkan warna jingga, coklat, coklat kehitaman (Devi, 2020).

8. Formulasi Sediaan Serum

Pada penelitian ini ekstrak daun katuk diformulasikan dalam sediaan serum dengan variasi konsentrasi 40%, 60% dan 80%.

Tabel 3.1 Formulasi Serum (Ferdy dkk., 2022)

Bahan	Konsentrasi (%)					Kegunaan
	K+	K-	FI	FII	FIII	
Ekstrak Daun						
Katuk			40	60	80	Zat Aktif Basis
Xanthan gum			0,5	0,5	0,5	serum
Propilen glikol	Klindamisin 10 µg/disk	DMSO 5%	15	15	15	Humektan Alkalizing
TEA			1	1	1	agent
Metil paraben			0,2	0,2	0,2	Pengawet
Aquadest ad			100	100	100	Pelarut

Keterangan :

K(+) : Klindamisin 10 µg/disk

K(-) : DMSO 5%

FI : Formulasi serum ekstrak daun katuk dengan konsentrasi 40%

FII : Formulasi serum ekstrak daun katuk dengan konsentrasi 60%

FIII : Formulasi serum ekstrak daun katuk dengan konsentrasi 80%

Cara pembuatan serum adalah sebagai berikut (Ferdy dkk., 2022) : *xanthan gum* dilarutkan dengan aquadest didalam mortir hingga terbentuk massa serum. Ditambahkan TEA kedalam mortir, aduk hingga homogen. Metil paraben dilarutkan dalam propilen glikol diaduk hingga homogen. Larutan metil paraben dan propilen glikol tadi dicampurkan ke dalam massa serum yang telah terbentuk, kemudian diaduk hingga homogen. Tambahkan zat aktif yaitu ekstrak daun katuk dimasukkan kedalam mortir lalu diaduk hingga homogen. Terakhir dimasukkan kedalam wadah.

9. Uji Mutu Fisik Serum

Pada pengujian mutu fisik meliputi uji organoleptik, uji homogenitas, uji pH, uji daya sebar, uji daya lekat dan uji viskositas untuk mengetahui formulasi serum memiliki sifat fisik yang baik.

a. Uji Organoleptik

Pada pengujian ini meliputi pengujian warna, bau dan bentuk dari sediaan serum wajah sebelum dan sesudah penyimpanan (Hasrawati dkk, 2020).

b. Uji pH

Sebanyak 0,5 g serum diencerkan dengan 5 ml aquades, kemudian uji dengan menggunakan pH meter. Akan muncul nilai pH pada pH meter (Emma, 2014).

c. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan serum pada preparat kaca kemudian diamati apakah bahan–bahan yang digunakan tersebut terdispersi merata pada lempeng kaca tersebut (Hasrawati dkk, 2020).

d. Uji Daya Sebar

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

e. Uji Daya Lekat

Sampel sebanyak 0,25 g diletakkan diantara 2 gelas objek pada alat uji daya lekat, kemudian ditekan beban 1 kg selama 5 menit, beban diangkat dan diberi beban 50 g pada alat dan dicatat waktu pelepasan serum (Ikhsanudin dkk, 2017).

f. Uji Viskositas

Sediaan serum dimasukkan kedalam alat viskotester menggunakan rotor nomor 3 dengan kecepatan 60 rpm dengan rentang

kekentalan yang dapat dibaca yaitu 100-4000 dPas (Hasrawati dkk, 2020).

10. Sterilisasi Alat

Alat-alat terlebih dahulu dicuci bersih dan dibilas dengan aquadest. Alat-alat yang terbuat dari gelas dibungkus dengan *alummunium foil* dan disterilkan dengan menggunakan oven suhu 180°C selama 2 jam. Alat-alat logam disterilkan dengan panas lampu spiritus selama 30 detik. Alat-alat karet dan plastik yang tidak tahan pemanasan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Bahan yang disterilisasi adalah media pertumbuhan yaitu *Blood Agar Plate* (BAP) dan media pengujian *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Wahyuningsih dkk, 2020).

11. Pembuatan Media

a. *Blood Agar Plate* (BAP)

Menimbang 20 g blood agar base dilarutkan 500 ml aquadest, panaskan hingga mendidih 10-15 menit hingga membentuk larutan sempurna. Sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit tekanan 1 atm. Kemudian biarkan selama 45 menit atau hingga suhu 40-45°C lalu ditambahkan darah domba steril 5-10% setelah itu dituang pada petri sebanyak 10 ml dan tunggu hingga memadat (Narulita, 2017).

b. *Mueller Hinton Agar* (MHA) + Darah Steril

Mueller Hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak 8,5 gram dilarutkan dalam 250 ml aquades di erlemenyer, aduk hingga homogen dan dipanaskan hingga mendidih menggunakan *hot plate* selama ±10 menit. Sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit tekanan 1 atm. Media tersebut didinginkan pada suhu 40-45°C lalu ditambahkan darah kelinci steril 5-10% setelah itu dituang pada petri sebanyak 10 ml dan tunggu hingga memadat (Narulita, 2017).

12. Peremajaan Bakteri *Propionibacterium acnes*

Siapkan media BAP disesuaikan dengan suhu ruang. Diinokulasi biakan murni bakteri *Propionibacterium acnes* kemudian digoreskan pada

media BAP dengan ose 4 zona. Diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C. (Narulita, 2017).

13. Pembuatan Suspensi Bakteri *Propionibacterium acne*

Untuk membuat suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yaitu biakan *Propionibacterium acnes* diambil dengan ose steril kemudian disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan sama dengan standar kekeruhan larutan 0,5 Mc. Farland (Narulita, 2017).

14. Larutan Uji Antibakteri

Larutan uji antibakteri yang digunakan adalah formulasi serum ekstrak daun katuk dengan 3 konsentrasi yaitu 40%, 60% dan 80%. Dalam uji antibakteri menggunakan kontrol negatif DMSO 5%. Larutan DMSO DMSO tidak memberikan daya hambat pertumbuhan bakteri sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan pengujian aktivitas antibakteri dengan metoda difusi agar (Narulita, 2017). Pembuatan larutan DMSO 5% dari 100% yaitu dengan cara dipipet 5 ml DMSO 100%, tambahkan aquades ke dalam labu ukur 50 ml, lalu homogenkan. Kontrol positif menggunakan kertas cakram yang telah terkandung klindamisin 10 µg/disk.

15. Pengujian Aktivitas Antibakteri *Propionibacterium acne*

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi kertas cakram (paper disk). Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* diambil menggunakan *cottond bud steril* diratakan pada media uji 4 zona. Kertas cakram steril dengan diameter 6 mm diresapi dengan DMSO 5% sebagai kontrol negatif dan serum ekstrak daun katuk dengan konsentrasi 40%, 60% dan 80% sebanyak 20 µl dan kertas cakram yang terkandung klindamisin 10 µg/disk. Diletakkan pada permukaan medium secara aseptik (*cottond bud steril*). Medium perlakuan ini dimasukan dalam anaerogen kit dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 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

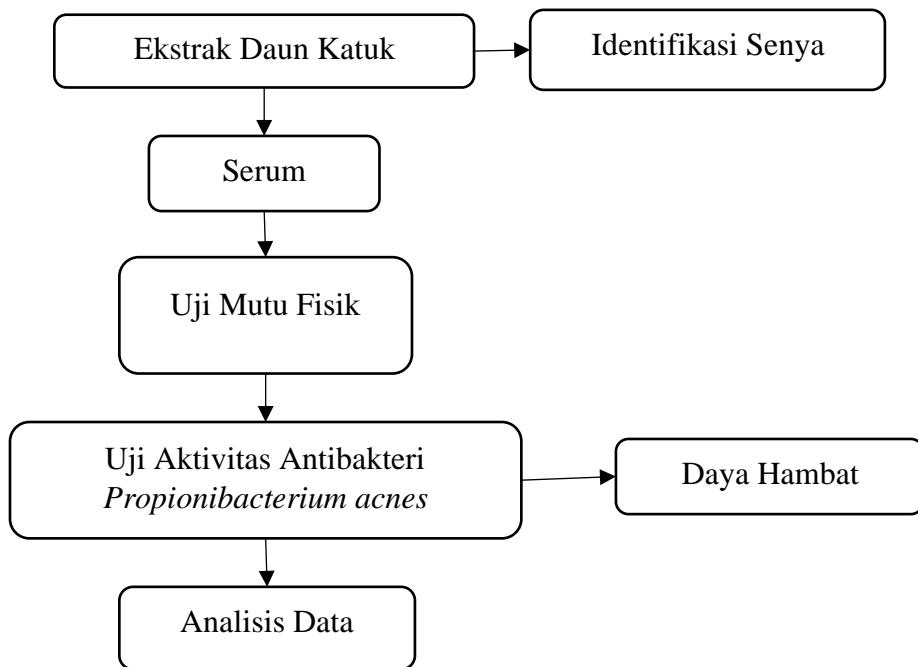
pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong untuk mengetahui daya hambatnya (Sa, adah dkk, 2020).

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan stabilitas fisik dan uji aktivitas sediaan serum ekstrak etanol daun katuk di sajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene Statistic*. Untuk mengetahui pengaruh diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dan uji daya sebar, uji daya lekat, uji pH, uji viskositas serum analisis menggunakan statistik *One Way ANOVA* dengan SPSS 21 (Arianti J, 2017).

I. Kerangka Konsep

Gambar 3.1. Skema Kerangka Konsep



J. Hipotesis

1. Ekstrak daun katuk (*Sauvagesia androgynus (L) Merr*) mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid.
2. Serum ekstrak etanol daun katuk (*Sauvagesia androgynus (L) Merr*) memiliki sifat mutu fisik yang baik .
3. Formulasi serum ekstrak daun katuk (*Sauvagesia androgynus (L) Merr*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

K. Kerangka Penelitian

Gambar 3.2 Skema Kerangka Penelitian

