

BAB III

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini, terdapat variabel bebas, variabel tergantung dan variabel kendali. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar ekstrak etanol buah mahkota dewa. Variabel tergantung meliputi uji organoleptis, daya sebar, daya lekat, viskositas, kejernihan, pH, homogenitas dan aktivitas antibakteri. Yang berlaku sebagai variabel kendali dalam penelitian ini adalah buah mahkota dewa.

A. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan gel ekstrak etanol buah mahkota dewa menggunakan bahan utama rajangan kering buah mahkota dewa yang didapatkan dari B2P2TO2T (Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional) di Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah. Sebagai bahan tambahan digunakan bahan kimia berupa karbopol 940 (kualitas farmasetis), trietanolamin (TEA) (kualitas farmasetis), sorbitol (kualitas farmasetis), air suling (kualitas farmasetis), TSA (*Triptricase Soy Agar*), TSB (*Triptricase Soy Broth*), NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*) dengan kualitas farmasetis, alkohol (kualitas farmasetis), Silika gel F₂₅₄ (kualitas farmasetis), butanol (kualitas farmasetis), asam asetat (kualitas farmasetis), dan benzoil peroksida 2,5 % sebagai zat pembanding yang berasal dari suatu sediaan antiakne yang sudah dipasarkan. Untuk uji aktivitas antibakteri gel ekstrak buah mahkota dewa menggunakan bakteri *P. acnes* dan *S. aureus*, yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan gel ekstrak buah mahkota dewa yaitu blender, *mixer*, kertas, penangas air, gelas beker, gelas ukur, cawan porselin, timbangan analitik, termometer, *waterbath*, pipet, pengaduk, kertas saring, kain mori, aluminium foil, pot gel, *stopwatch*, viskometer *Brookfield*, alat uji daya sebar (Farmasi UII), alat uji daya lekat (Farmasi UII), kertas pH,

homogenizer, baskom, *evaporator rotary vacuum*, spatula, kompor listrik, erlenmeyer, kapas, kertas sampul, tabung reaksi, petridisk, autoklaf, LAF (*Laminar Air Flow*), *bluetip*, *yellowtip*, jangka sorong, pinset, inkubator, mikropipet dan alat uji KLT (kromatografi lapis tipis).

B. Cara Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman buah mahkota dewa dilakukan di B2P2TO2T (Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional) di Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah dengan kunci determinasi *Backer* dan *van Den Brink*.

2. Ekstraksi Simplisia Buah Mahkota Dewa

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Simplisia kering ditimbang sesuai kebutuhan kemudian diblender sehingga terbentuk serat-serat halus, dimasukkan ke dalam wadah dan direndam menggunakan etanol 96% pada suhu ruangan sampai jenuh. Maserat disaring, filtratnya disimpan sementara residunya direndam kembali dalam pelarut yang sama. Perlakuan ini diulang hingga filtrat tidak berwarna atau bening. Filtrat yang diperoleh dijadikan satu kemudian dipekatkan dengan *evaporator rotary vacuum* pada suhu 30°-40°C sehingga diperoleh ekstrak kental^(4,15). Jumlah ekstrak yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot awal bahan (g)}} \times 100\%$$

3. Identifikasi Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa

Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi. Identifikasi ekstrak ini bertujuan untuk memberikan gambaran tentang kualitas ekstrak yang diperoleh dan digunakan dalam penelitian. Identifikasi ekstrak meliputi beberapa uji, yaitu uji organoleptis, kadar air ekstrak, kadar etanol ekstrak, viskositas ekstrak, dan kandungan flavonoid ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan KLT.

a. Uji Organoleptis Ekstrak

Mengamati secara langsung ekstrak etanol buah mahkota dewa yang didapat dari hasil perovasi. Pengamatan meliputi warna, bentuk, dan bau ekstrak.

b. Uji Susut Pengerinan Ekstrak

Diambil 0,5 gram ekstrak etanol dan dimasukkan kedalam alat uji kadar air. Hasil pengukuran kadar air dapat diamati langsung pada alat uji kadar air.

c. Uji Viskositas Ekstrak

Sejumlah 100 ml ekstrak ditempatkan pada wadah uji, *water pass* dipastikan terdapat ditengah dan dilihat angka viskositas yang ditunjukkan oleh viskometer brookfield.

d. Uji Kandungan Flavonoid Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa dengan KLT

Digunakan ekstrak kental yang diperoleh dengan penguapan menggunakan *evaporator rotary vacuum*. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk senyawa flavonoid diperoleh, dengan fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak Butanol: Asam asetat: Aquades (4: 1: 5)⁽⁶⁾.

4. Formula Sediaan Gel Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa

a. Formula Standar⁽³⁶⁾

R/ Ketoconazole	2	%
Karbopol 940	1	%
Trietanol amine	0,5	%
Propylene glycol	10	%
Etanol	2,5	%
Air (q.s)	100	ml

b. Formula Modifikasi Gel Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa

Tabel I. Formula sediaan gel buah mahkota dewa dengan variasi kadar ekstrak buah mahkota dewa (b/v)

Bahan	Formulasi I	Formulasi II	Formulasi III	Formulasi IV
Ekstrak buah mahkota dewa (%)	-	1	3	5
Karbopol 940 (%)	1	1	1	1
Trietanolamin (%)	3, 5	3, 5	3, 5	3, 5
Sorbitol (%)	35	35	35	35
Aquadest (q. s)	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

5. Pembuatan Sediaan Gel Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa

Gel dibuat dalam 4 formulasi dimana formulasi I merupakan formulasi yang hanya berisi basis gel saja. Perbedaan formulasi gel pada pada formulasi II, III, dan IV terletak pada konsentrasi zat aktif yang dipakai. Adapun variasi zat aktifnya yaitu 1%, 3%, dan 5%, sedangkan konsentrasi basis yang digunakan semua sama. Karbopol 940 yang digunakan diletakkan ke dalam gelas beker dan direndam dengan air suling selama 24 jam dalam keadaan tertutup. Zat aktif dilarutkan dengan sorbitol, kemudian ditambahkan bahan tambahan lainnya termasuk karbopol yang telah direndam sebelumnya⁽³⁶⁾. Sediaan gel kemudian dimasukkan kedalam pot gel yang telah disiapkan dan disimpan pada suhu kamar kemudian dilakukan uji sifat fisik berupa uji organoleptis, uji daya sebar, uji daya lekat, uji viskositas, uji kejernihan, uji pH dan uji homogenitas. Pembuatan gel dilakukan secara aseptis dimana bahan-bahan yang digunakan (tidak termasuk ekstrak) disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf pada tekanan 121 Pa selama 15 menit dan proses pembuatan gel dilakukan di dalam LAF.

6. Uji Stabilitas Fisik

Data mengenai stabilitas fisik dari gel dapat diperoleh dari hasil uji organoleptis, uji daya sebar, uji daya lekat, uji viskositas, uji kejernihan, uji pH dan uji homogenitas sediaan gel ekstrak etanol buah mahkota dewa yang dilakukan dengan replikasi sebanyak tiga kali. Gel yang telah jadi disimpan pada suhu kamar ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) selama 8 minggu dan diuji setiap 2 minggu sekali.

a. Organoleptis

Sediaan diamati secara visual warna, bentuk dan baunya⁽³⁸⁾.

b. Daya Sebar

Pengujian daya sebar gel dilakukan untuk menunjukkan luas daerah penyebaran gel pada saat diaplikasikan ke kulit. Sebanyak 0,1 gram gel yang akan diuji diletakkan pada gelas objek berukuran 5,5 cm. Gelas objek yang lain diletakkan di atas kaca objek yang berisi sediaan gel. Kemudian diletakkan beban seberat 1 kg selama 5 menit di atas kaca objek secara perlahan sehingga gel menyebar ke seluruh lapisan kaca objek. Beban dipindahkan dari kaca objek dan sediaan gel yang keluar dari kaca objek dibersihkan dengan tisu. Kemudian diikatkan beban seberat 80 g pada salah satu kaca objek dan digeser perlahan hingga kedua kaca objek tersebut terpisah satu sama lain. Waktu yang dibutuhkan untuk memisahkan kedua kaca objek dicatat. Daya sebar dihitung dengan rumus:

$$S = m \times \frac{l}{t} \text{ (39)}$$

Keterangan:

S = daya sebar

m = berat beban (80 g)

l = panjang kaca objek (5,5 cm)

t = waktu pemisahan (s)⁽³⁹⁾.

c. Daya Lekat

Sebanyak 0,1 g diratakan pada salah satu kaca objek kemudian ditutup dengan kaca objek yang lain. Pada bagian atas ditekan dengan beban seberat 1 kg sehingga gel menyebar ke seluruh lapisan kaca objek dan kemudian beban dipindahkan.. Pasangan kaca objek ini kemudian dipasang pada alat uji daya lekat yang telah diberi beban sebesar 80 g, dan dicatat waktu yang dibutuhkan oleh 2 objek gelas untuk memisah⁽³⁹⁾.

d. Viskositas

Gel diletakkan dalam gelas beker kemudian diuji viskositasnya menggunakan viskometer *Brookfield* menggunakan spindle nomer S 64 dengan kecepatan 0,5 rpm selama 30 menit pada suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ⁽³⁸⁾.

e. Uji Kejernihan

Diamati secara visual tampilan sediaan gel keruh atau jernih⁽³⁸⁾.

f. Uji pH

Sediaan gel diuji menggunakan kertas pH dengan mencelupkan kertas pH selama satu menit kedalam sediaan dan hasilnya dicocokkan dengan pH universal.

g. Homogenitas

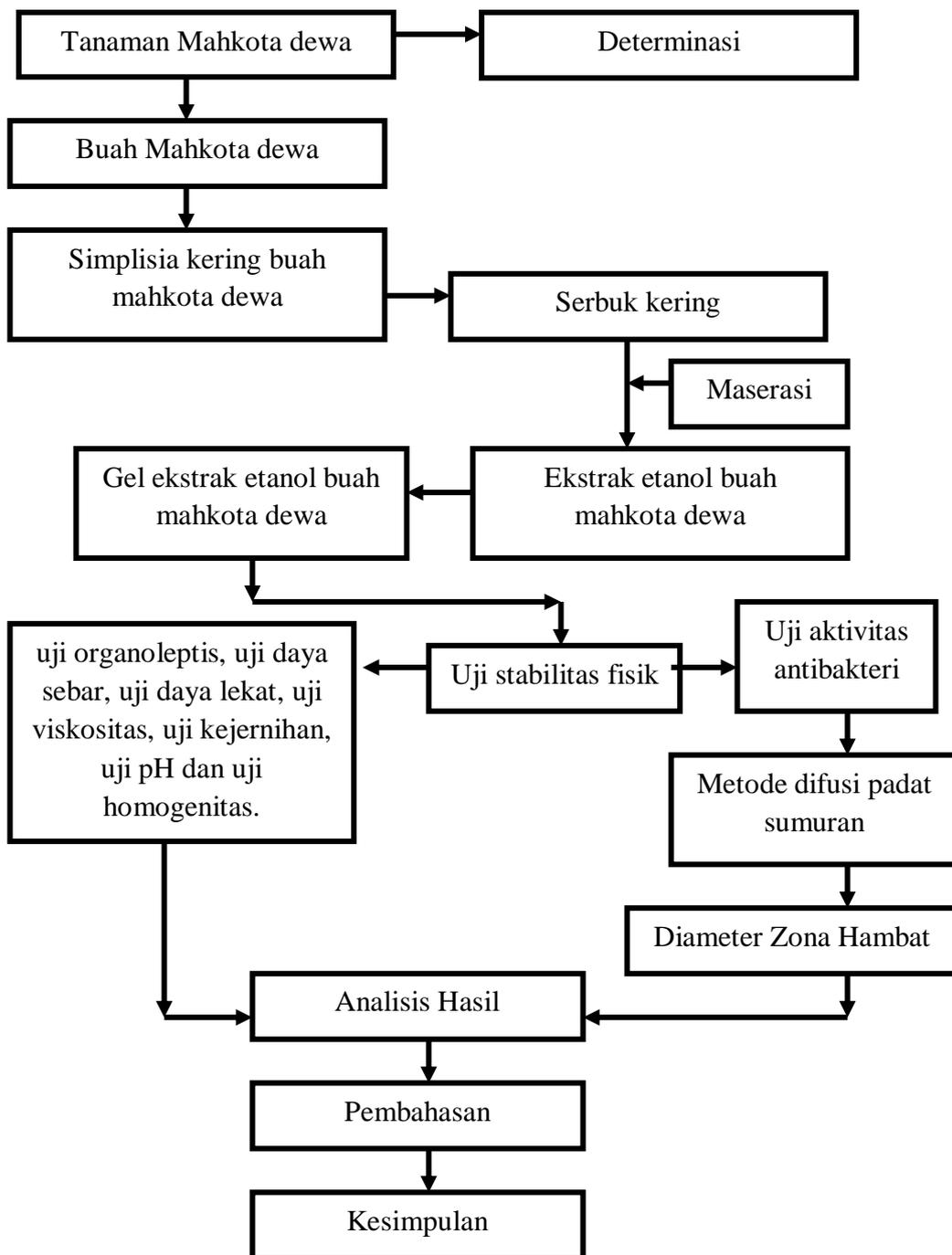
Homogenitas merupakan salah satu ukuran dari kualitas sediaan gel. Gel yang akan diuji dioleskan pada sebuah gelas objek untuk diamati homogenitasnya. Apabila tidak mengandung butiran-butiran kasar di atas gelas objek tersebut, maka gel yang diuji homogen⁽³⁸⁾.

7. Uji Aktivitas Antibakteri Gel Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa Secara In vitro terhadap Bakteri *P. acnes* dan *S. aureus*

Uji aktivitas antibakteri dimulai dengan mempersiapkan media pembiakan bakteri. Media dibuat dengan melarutkan sejumlah TSA sebagai media pembiakan *P. acne* dan NA sebagai media pembiakan *S. aureus* menggunakan air suling dan dipanaskan hingga didapat larutan media berwarna bening (menandakan bahwa media telah melarut sempurna). Larutan media kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, ditutup dengan kapas dan dilapisi dengan *aluminium foil*. Selanjutnya dilakukan sterilisasi terhadap larutan media dan peralatan yang dipergunakan dalam uji antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran pada lempeng agar TSA dan NA yang telah ditanami 200 µl bakteri *P. acnes* pada media TSA dan bakteri *S. aureus* pada media NA⁽³⁷⁾. Uji aktivitas antibakteri gel ekstrak buah mahkota dewa terhadap *P. acnes* dan *S. aureus* dilakukan di dalam LAF dengan membuat enam sumuran pada media, sumur pertama hingga keempat berisi gel formula satu hingga empat dimana formula keempat merupakan kontrol negatif. Semur kelima berisi antibakteri pembanding (Benzoil Peroksida 2,5%) sebagai kontrol positif, sumur keenam berisi ekstrak murni dengan kadar tertinggi. Dibuat tiga replikasi, kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu 37° C selama 3 hari. Inkubasi dilakukan menggunakan *jar* anaerob yang dilengkapi dengan katalisator dan indikator pada media yang berisi *P. acne*. Ada tidaknya daya hambat dapat dilihat dari ada

tidaknya zona hambat yang ditunjukkan dengan ada tidaknya zona jernih di sekeliling sumuran. Kemudian diukur masing-masing diameter zona hambat dan dimasukkan dalam tabel pengamatan. Kemudian dibandingkan dengan antibiotik pembanding⁽³⁷⁾.

8. Skema Penelitian



Gambar 8. Skema Penelitian

C. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan secara statistik dengan tingkat kepercayaan 95%. Data hasil pengamatan stabilitas fisik sediaan gel ekstrak etanol buah mahkota dewa dianalisa dengan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov Smirnov*. Data dikatakan terdistribusi normal jika $p > 0,05$ dan dilanjutkan dengan analisis uji parametrik *two way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* jika hasilnya signifikan. Sedangkan pada uji aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus* data yang didapat dianalisis dengan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov Smirnov*. Jika data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan analisis uji parametrik *one way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Tukey* jika hasilnya signifikan.