

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode penelitian kuantitatif atau eksperimental, dengan membandingkan pengaruh konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus* K.) terhadap aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dan sifat fisik gel.

##### **B. Lokasi dan Waktu**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus sampai dengan November 2022.

##### **C. Populasi dan Sampel**

Daun kenikir yang diperoleh dari Desa Sorowajan, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, D.I. Yogyakarta.

##### **D. Variabel Penelitian**

###### **1. Variabel bebas**

Variable bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus* K.).

###### **2. Variabel terikat**

Variable terkontrol dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, dan sifat fisik sediaan gel yang meliputi organoleptik, pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, dan viskositas.

###### **3. Variabel terkontrol**

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah media tumbuh bakteri metode difusi kertas cakram.

### E. Definisi Operasional

1. Gel merupakan sediaan topikal semi padat yang memberikan rasa nyaman saat digunakan karena menciptakan lingkungan lembab, rasa dingin dan menyerap dengan baik pada kulit serta mudah dibersihkan menggunakan air.
2. Konsentrasi ekstrak etanol daun kenikir (*Cosmos caudatus* K.) dibuat dalam beberapa seri konsentrasi yakni 10 mg/ml, 20 mg/ml dan 30 mg/ml.
3. Metode difusi cakram dilakukan sebagai metode uji aktivitas antibakteri. Pengukuran diameter zona hambat pada media menggunakan jangka sorong.

### F. Alat dan Bahan

1. Alat
  - a. Alat yang digunakan untuk ekstraksi yaitu spatula kayu, toples maserasi, ayakan 40 mesh, grinder (Getra), corong, gelas ukur, gelas beker.
  - b. Alat untuk karakterisasi ekstrak dan uji fitokimia yaitu tabung reaksi, rak tabung, pipet tetes, pipet ukur, *droplate*, pH meter (Hanna HI 98190), *moisture analyser* (Ohaus MB 90).
  - c. Alat yang digunakan untuk membuat formula gel dan uji sifat fisik yaitu timbangan analitik (Ohaus PA 2202), *hot plate stirrer*, pH meter (Hanna HI 98190), Viscometer Brookfield (DVI Viscometer), alat uji daya lekat (Lokal), alat uji daya sebar (Lokal), mortir, stamper, dan alat gelas lainnya (*iwaki*).
  - d. Alat untuk uji aktivitas antibakteri yaitu *Biological Safety Cabinet* (BSC), autoklaf (Gea LS-B 50L), incubator (Mettler IN30), cawan petri, ose, batang L, bunsen, jangka sorong, pinset, mikropipet, gelas beker, *blue tip*.
2. Bahan
  - a. Bahan yang digunakan pada determinasi yaitu daun kenikir (*Cosmos caudatus* K.)

- b. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi yaitu serbuk simplisia daun kenikir, etanol 70% (teknis), kertas saring.
- c. Bahan yang digunakan untuk karakterisasi ekstrak yaitu akuades, HCl 2 N (p.a), pereaksi Bouchardat LP (p.a), pereaksi metanol (p.a), Mayer LP (p.a), asam sulfat pekat (p.a), NaOH 10% (p.a), FeCl<sub>3</sub> 1% (p.a), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (p.a), BaCl<sub>2</sub> 1%.
- d. Bahan yang digunakan untuk formula gel yaitu HPMC (farmasetis), propilenglikol (farmasetis), akuades, kertas saring.
- e. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* (Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi UGM), Mueller-Hinton agar (MHA), Nutrien agar (NA), NaCl 0,9%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (p.a), BaCl<sub>2</sub> 1%, kertas cakram blank, kloramfenikol, octadin gel.

### G. Pelaksanaan Penelitian

#### 1. Ekstraksi

##### a. Sortasi tanaman

Daun kenikir (*Cosmos caudatus* K.) yang masih segar dengan daun berwarna hijau muda, utuh, tidak rusak, dan berada pada tangkai urutan ke 3-5.

##### b. Determinasi Tanaman

Determinasi di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta untuk memastikan bahwa spesimen yang digunakan merupakan tanaman yang akan diteliti.

##### c. Pembuatan Simplisia

Daun kenikir (*Cosmos caudatus* K.) dipisahkan bagian daun dan batangnya, kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Daun kenikir dikeringkan dengan cara dijemur (saat penjemuran dilapisi kain berwarna hitam). Setelah kering, daun kenikir dihaluskan menggunakan grinder.

d. Pembuatan Ekstrak

500 gram sampel dimasukkan ke dalam bejana maserasi, kemudian ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1:10 hingga sampel terendam. Bejana maserasi ditutup rapat dan didiamkan selama 3 hari dengan sesekali dilakukan pengadukan. Kemudian dilakukan penyaringan dengan kertas saring untuk memisahkan antara residu dan filtrat. Hasil filtrat diuapkan sampai diperoleh ekstrak kental. Kemudian rendemen dihitung. Perhitungan dapat dilihat pada rumus dibawah ini.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak akhir (g)}}{\text{berat simplisia awal (g)}} \times 100\% \dots (2)$$

2. Karakterisasi Ekstrak

a. Organoleptik

Uji dilakukan meliputi bau, warna dan bentuk dari ekstrak (Depkes, 1995).

b. Penetapan Moisture content

Penetapan kadar air dilakukan menggunakan *moisture analyzer*. Penetapan kadar air dilakukan dengan memasukkan sampel ke dalam *moisture analyzer*, diatur suhu 105°C kemudian ditunggu sampai layar monitor berwarna hijau selama beberapa menit (Kumalasari, 2012)

c. pH

100 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 ml akuades yang kemudian pH meter dicelupkan kedalam larutan ekstrak. Pengukuran dilakukan untuk melihat pH dari ekstrak yang dihasilkan.

d. Skrining Fitokimia

1) Alkaloid

100 mg sampel ditimbang, dan ditambahkan 10 ml HCL 2N. Kemudian larutan dipanaskan ±2 menit, kemudian di dinginkan dan di saring. Diambil 3 tetes filtrat dan ditambahkan Bouchardat LP 2 tetes. Terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam pada penambahan Bouchardat LP, endapan berwarna putih atau kuning

yang larut pada penambahan Mayer LP, dan terbentuknya endapan berwarna merah bata pada penambahan Dragendorf LP menunjukkan hasil yang positif (Depkes, 1989).

## 2) Flavonoid

100 mg sampel ditambahkan dengan akuades 100 ml hingga terendam kemudian dipanaskan, selanjutnya ditambahkan NaOH 10% atau  $H_2SO_4$  ditambahkan pada filtrate. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan warna merah atau orange yang terbentuk setelah penambahan NaOH 10% atau warna merah akibat penambahan  $H_2SO_4$  menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Depkes, 1989).

## 3) Saponin

100 mg sampel ditambahkan air panas 10 ml, didinginkan kemudian dikocok selama  $\pm 10$  detik. Buih yang terbentuk mantap setinggi 1 cm sampai 10 cm selama  $\pm 10$  menit. Hasil positif ditunjukkan dengan buih tidak hilang saat penambahan HCl 2N untuk mengamati tekanan buih yang terbentuk (Depkes, 1989).

## 4) Tanin

100 mg sampel ditambahkan etanol, kemudian 1 ml larutan diambil dan ditambahkan 2-3 tetes  $FeCl_3$  1%. Terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau menunjukkan hasil positif (Sangi dkk, 2008).

## 3. Formulasi gel ekstrak daun kenikir

Formula gel ekstrak daun kenikir (tabel 3). Adapun prosedur pembuatan gelnya adalah sebagai berikut:

- a. Bahan ditimbang
- b. HPMC didispersikan dalam 20 ml akuades pada suhu 80-90°C dan diaduk selama 5-10 menit sampai tercampur merata (campuran A).
- c. Pada wadah terpisah ekstrak dilarutkan dalam 50 ml akuades sampai homogen yang kemudian disaring (campuran B).

- d. Dicampurkan campuran A dengan campuran B  
 e. Propilenglikol dan sisa akuades ditambahkan dan diaduk homogen.

**Tabel 3. Formula Gel Menurut Sagala (2017)**

Bahan	Fungsi	Formula			
		FI	FII	FIII	Basis gel
Ekstrak Daun Bangun-bangun	Zat aktif	1 g	1 g	1 g	0 g
HPMC	<i>Gelling agent</i>	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
Propilenglikol	Humektan	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Metil Paraben	Pengawet	0,09 g	0,09 g	0,09 g	0,09 g
Propil Paraben	Pengawet	0,01 g	0,01 g	0,01 g	0,01 g
Akuades	Pelarut	ad 50 ml	ad 50 ml	ad 50 ml	ad 50 ml

**Tabel 4. Formula Gel Ekstrak Daun Kenikir (Modifikasi)**

Bahan	Fungsi	Formula			
		FI	FII	FIII	Basis gel
Ekstrak Daun Kenikir	Zat aktif	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	-
HPMC	<i>Gelling agent</i>	1 g	1 g	1 g	1 g
Propilenglikol	Humektan	11 g	11 g	11 g	11 g
Akuades	Pelarut	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g

4. Evaluasi sifat fisik sediaan gel ekstrak daun kenikir

a. Organoleptik

Uji yang dilakukan meliputi warna, bau, bentuk dan tekstur sediaan gel selama waktu penyimpanan pada suhu ruang (27-28°C) (Depkes, 1995).

b. Homogenitas

Sediaan gel dioleskan pada kaca objek yang kemudian diratakan. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui apakah partikel sudah tercampur secara homogen (Depkes, 1995). Sediaan dikatakan homogen apabila tidak terjadi gumpalan dari bahan yang belum tercampur, jernih dan tembus cahaya (Ansel, 1989).

c. pH

100 mg gel dilarutkan dalam 10 ml akuades kemudian dicelupkan pH meter. pH sediaan harus sama dengan pH fisiologis kulit yaitu 4,5 – 6,5 (Tranggono, 2007).

d. Daya Sebar

Diletakkan 500 mg gel pada kaca bulat berskala, kemudian ditutup dengan menggunakan kaca bulat lain. Diukur diameter penyebaran secara melintang dan membujur. Setiap 1 menit dilakukan penambahan beban 50 gram sampai dengan berat total 150 gram dan diukur diameter sebar gel. (Yusuf dkk., 2017).

e. Viskositas

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield. Gel dimasukkan kedalam wadah, kemudian spindle nomor 6 dipasang dengan kecepatan 50 rpm. (Ardana dkk., 2015).

f. Daya Lekat

500 mg gel diambil kemudian diletakkan diatas kaca objek dan ditutup dengan menggunakan kaca objek lainnya. Kemudian diberi beban seberat 1 kg selama 5 menit. Kedua kaca objek dipasangkan pada alat uji daya lekat, kemudian ditarik tuas dan secara bersamaan dicatat waktu yang dibutuhkan oleh kedua plat untuk saling lepas (Yusuf dkk., 2017).

5. Uji aktivitas antibakteri

a. Sterilisasi alat

Alat-alat dicuci, dikeringkan kemudian dibungkus menggunakan kertas payung. Selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C (Astutiningrum, 2016).

b. Pembuatan media

1) Peremajaan bakteri

1 gram media *Natrium Agar* (NA) dilarutkan dengan 50 ml akuades dalam erlenmeyer yang dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya media dituangkan ke dalam tabung reaksi, ditutup lubang dengan menggunakan kain kasa dan dibungkus *aluminium foil*. Kemudian media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

Kemudian ditunggu media memadat dengan kemiringan 30° (Napitupulu dkk., 2019).

2) Media uji aktivitas antibakteri

6,8 gram media Marck Mueller-Hinton Agar (MHA) dilarutkan dalam 200 ml akuades menggunakan erlenmeyer yang dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah itu lubang Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan *aluminium foil* yang kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian media dituangkan ke dalam cawan petri dan ditunggu media memadat (Nurhayati dkk., 2020).

c. Standar *Mc Farland* 0,5

Standar *Mc Farland* 0,5 dibuat menggunakan 9,95 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dan 0,05 ml BaCl<sub>2</sub> 1%. Kekeruhan larutan dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji dimana estimasi jumlah bakteri adalah 1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/ml (Paramita, 2011).

d. Peremajaan bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasikan pada media *Nutrien Agar* miring. Media yang sudah diinokulasi disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Astutiningrum, 2016).

e. Suspensi bakteri

Ujung ose bakteri diambil dari hasil peremajaan, kemudian disuspensikan koloni bakteri ke dalam larutan NaCl 0,9% dan disetarakan dengan kekeruhan larutan *Mc farland* 0,5 (Rukmana & Mulyowati, 2015).

f. Uji daya hambat metode difusi kertas cakram ekstrak daun kenikir dan gel mengandung ekstrak daun kenikir

0,1 ml bakteri uji diambil kemudian diinokulasikan dengan media MHA dan diratakan menggunakan batang L. Kertas cakram dicelupkan hingga jenuh (±5 menit) pada variasi konsentrasi 10 mg/ml, 20 mg/ml dan 30 mg/ml ekstrak daun kenikir dan gel ekstrak daun kenikir yang digunakan kemudian diletakkan di atas media secara aseptik. Cawan

petri ditutup, kemudian media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu diamati dan diukur diameter zona hambat yang terbentuk. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif pada uji ekstrak. Sedangkan octadin gel digunakan sebagai kontrol positif dan basis gel sebagai kontrol negatif pada uji sediaan gel.

#### H. Analisis Data

Analisis statistik dilakukan menggunakan uji *One Way Anova*. Analisis data terlebih dahulu dilakukan dengan menggunakan uji normalitas (Shapiro-Wilk) dan homogenitas (Levene) untuk melihat apakah data terdistribusi secara homogen dan normal atau tidak. Apabila data yang dihasilkan terdistribusi secara homogen dan normal maka analisis dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Jika data tidak homogen atau normal maka uji dilakukan menggunakan non parametrik yaitu Kruskal-Wallis.