

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain eksperimental, untuk penentuan formula optimum kombinasi HPMC dan karbopol yang digunakan sebagai *gelling agent* pada gel *hand sanitizer* daun kersen (*Muntingia calabura L.*).

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan September sampai November 2022.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi HPMC dan karbopol 940.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini meliputi sifat fisik dari sediaan gel yaitu uji pH, uji daya sebar, uji viskositas, uji homogenitas dan uji daya lekat sediaan gel *hand sanitizer*.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah kecepatan pengadukan dan lamanya pengadukan saat proses pembuatan gel.

D. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak daun kersen adalah ekstrak kental yang diperoleh dengan metode maserasi daun kersen menggunakan pelarut etanol 70%.
2. *Gelling agent* adalah bahan yang digunakan untuk membentuk masa gel. Dalam penelitian ini *gelling agent* yang digunakan yaitu kombinasi antara karbopol 940 dengan HPMC.
3. *Simplex lattice design* adalah suatu metode optimasi yang dapat digunakan untuk menentukan formula optimal dari suatu campuran dua bahan atau lebih.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan yaitu oven (Memmert), *homogenizer* (IKA T25), *moisture balance* (Ohaus MB 90), timbangan analitik (Ohaus PA 2202), pH meter (Hanna), viskometer Brookfield tipe DV-1, *hot plate* (Ika® C-MAG HS7), autoclave (type B-one), alat ukur daya sebar, alat ukur daya lekat, jangka sorong, blender, magnetic stirer, perangkat alat maserasi, penggaris, dan alat-alat gelas laboratorium lainnya (*iwaki*).

2. Bahan

Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.), HPMC (farmasetis), karbopol 940 (farmasetis), trietanolamin (farmasetis), gliserin (farmasetis), metil paraben (farmasetis), etanol 70% (teknis), etanol 95% (teknis), FeCl₃ (p.a), reagen mayer (p.a), reagen dragendorff (p.a), kertas saring dan akuades.

F. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan simplisia daun kersen

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dipanen dari kecamatan Gamping kabupaten Sleman, Yogyakarta. Daun kersen disortasi untuk memisahkan dari daun yang tidak layak untuk digunakan. Kemudian daun kersen yang terpilih, dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan dikeringanginkan pada suhu ruang hingga daun menjadi kering. Kemudian dikeringkan kembali menggunakan oven selama 3 hari. Selanjutnya daun kersen dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan nomer 40 hingga diperoleh serbuk simplisia sebanyak 800 g.

2. Ekstraksi daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

Pembuatan ekstrak etanol daun kersen dilakukan dengan metode maserasi. 800 g serbuk daun kersen direndam dengan 8 L etanol 70% (1 : 10 bagian). Rendaman serbuk daun kersen ditutup dengan aluminium foil agar terlindung dari cahaya dan dibiarkan selama 5 hari (diaduk setiap harinya). Maserat kemudian disaring dengan kertas saring sehingga dihasilkan filtrat pertama. Residu kemudian dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 70% sebanyak 2,7 L selama 2 hari, lalu disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat kedua. Filtrat pertama dan filtrat kedua dicampurkan, kemudian dipekatkan di atas kompor listrik menggunakan wajan pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental (Anief, 2010). Ekstrak yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya. Berikut adalah cara menghitung % rendemen:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot serbuk simplisia}} \times 100 \% \dots \dots \dots (2)$$

3. Karakterisasi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis adalah pengujian fisik sediaan meliputi bentuk, warna dan bau secara visual (Tinctura *et al.*, 2021).

b. Uji kadar air

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang. Ekstrak dimasukan ke dalam alat *moisture balance* yang telah diatur pada suhu 105°C selama 30 menit (Hanif *et al.*, 2018).

c. Uji pH

Pemeriksaan pH dilakukan menggunakan pH meter. pH yang baik adalah sesuai dengan pH kulit yaitu antara 5-6,5 (Kaur, 2013).

d. Skrining fitokimia daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

1) Identifikasi senyawa saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL akuades dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik (terbentuk buih selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1–10 cm). Sampel dinyatakan mengandung saponin apabila buih tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2N (Depkes RI, 1980).

2) Identifikasi senyawa alkaloid

Sebanyak 500 mg ekstrak ditambahkan akuades sebanyak 9 ml kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi, masing-masing tabung ditambahkan 2 tetes LP (larutan pereaksi) Mayer dan Dragendorf. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuk endapan putih atau kuning pada tabung reaksi dengan LP Mayer; terbentuk endapan kuning jingga pada tabung reaksi dengan LP Dragendorf. Sampel dinyatakan mengandung alkaloid apabila 2 uji di atas memberikan hasil reaksi positif (Depkes RI, 1980).

3) Identifikasi senyawa flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol 95%. Kemudian campuran ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 10 mL HCl pekat. Sampel dinyatakan mengandung flavonoid apabila terbentuk warna merah jingga atau merah ungu pada hasil reaksi (Depkes RI, 1980).

4) Identifikasi senyawa steroid

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditimbang dan ditambahkan 1 mL eter, kemudian didiamkan selama 2 jam. Filtrat diuapkan pada cawan penguap. Residu ditambahkan dengan asam asetat anhidrat, kemudian ditetesi dengan pereaksi Liebermann–Burchart. Sampel dinyatakan mengandung steroid apabila terbentuk warna ungu dan merah yang kemudian berubah menjadi hijau tua setelah ditambahkan dengan pereaksi tersebut (Harborne, 1987).

5) Identifikasi senyawa tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak diencerkan dengan akuades sampai hampir tidak berwarna. Kemudian 2 mL larutan ekstrak diambil dan ditambahkan dengan 2 tetes larutan FeCl_3 10%. Sampel dinyatakan mengandung tanin apabila terbentuk larutan berwarna biru atau hijau (Harborne, 1987).

4. Optimasi formula gel *hand sanitizer* ekstrak daun kersen

Formula yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil modifikasi dari formula gel hand sanitizer yang dibuat oleh Ardika (2016). Formula yang diganti yaitu ekstrak daun kersen sebagai zat aktif dan proporsi komposisi basis gel HPMC dan karbopol. Optimasi gel *hand sanitizer* ekstrak daun kersen dengan kombinasi *gelling agent* HPMC dan karbopol 940 menggunakan metode *Simplex Lattice Design*. Setiap formula gel hand sanitizer ekstrak daun kersen dibuat sebanyak 100 ml dengan komposisi bahan yang tertera pada tabel

2.

Tabel 2. Optimasi formula gel *hand sanitizer* ekstrak daun kersen kombinasi *gelling agent* karbopol 940 dan HPMC menggunakan *Simplex Lattice Design*

Bahan	Run (gram)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Ekstrak Daun Kersen	3	3	3	3	3	3	3	3
HPMC	3	2	2,5	3	2,5	2,75	2	2,25
Karbopol 940	1	2	1,5	1	1,5	1,25	2	1,75
TEA	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Gliserin	5	5	5	5	5	5	5	5
Metil Paraben	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Akuades	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Sediaan gel ekstrak daun kersen dibuat dengan prosedur sebagai berikut:

- 1) Basis gel (Karbopol 940 dan HPMC) dikembangkan dengan akuades panas dan disisihkan (bagian pertama)
 - 2) Metil paraben dilarutkan dalam sebagian gliserin (bagian kedua).
 - 3) Ekstrak daun kersen dilarutkan dalam akuades kemudian disaring dan ditambahkan ke dalam bagian kedua diatas.
 - 4) Trietanolamin ditambahkan, kemudian sisa gliserin dimasukkan dan diaduk hingga homogen.
 - 5) Setelah itu campuran di atas dimasukkan ke dalam basis yang telah dikembangkan (bagian pertama).
 - 6) Kemudian sisa akuades dimasukkan, proses pengadukan dilakukan menggunakan homogenizer dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit hingga membentuk massa gel yang homogen.
5. Evaluasi fisik sediaan gel *hand sanitizer*
- a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis sediaan dilakukan dengan mengamati warna, bau, dan bentuknya (Putri *et al.*, 2019).

b. Uji pH

Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Sebanyak 0,5 gram gel dilarutkan dengan 5 ml akuades dan dicek pH larutannya (Sayuti, 2015).

c. Uji Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan terhadap sediaan gel dengan menggunakan viskometer Brookfield pada spindle nomor 7. Kemudian spindle dicelupkan ke dalam gel dengan kecepatan putaran 50 rpm.

d. Uji Homogenitas

Gel diamati secara visual dengan mengoleskan gel pada permukaan kaca objek kemudian ditutup dengan kaca objek lainnya dan dirapatkan. Gel diamati apakah terdapat butiran kasar atau bagian yang tidak tercampur dengan baik. Jika tidak ditemukan butiran kasar artinya gel homogen (Tambunan, 2018).

e. Uji Daya Sebar

Sediaan gel ditimbang 0,5 gram dan diletakkan di tengah kaca bulat yang berskala dan ditutup dengan kaca bulat lain. Kemudian dilakukan pengukuran diameter penyebaran tiap penambahan beban 50 gram hingga berat total 150 gram. Daya sebar yang memenuhi syarat yaitu 5-7 cm (Wulandari, 2015).

f. Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan meletakkan gel 0,25 gram diantara 2 gelas obyek. Kemudian gelas obyek ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu beban diangkat dari gelas obyek, kemudian dipasang gelas obyek pada alat tes (tali). Alat uji diberi beban 80 gram dan kemudian dicatat waktu pelepasan gel dari kedua gelas obyek. Syarat daya lekat yang baik yaitu lebih dari 1 detik (Ginarana, 2019).

6. Penentuan Formula Optimum dengan Metode *Simplex Lattice Design*

Analisis formula optimum dilakukan dengan menggunakan *software Design Expert 7* setelah diperoleh nilai hasil uji pH, daya lekat, daya sebar dan viskositas. Semua formula gel yang diperoleh diformulasi berdasarkan urutan *run* 1 sampai 8, diuji sifat fisik gelnya dan diolah menggunakan *software*. Dari *Software Design Expert 7*, ditentukan nilai *desirability* yang tertinggi.

7. Verifikasi Formula Optimum

Verifikasi formula optimum dilakukan dengan membandingkan hasil pengujian sifat fisika (pH, daya sebar, daya lekat dan viskositas) pada formula optimum dengan hasil respon formula optimum yang sudah diprediksi oleh *software Design Expert 7*. Tujuannya adalah untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antara hasil uji dengan nilai respon yang diprediksi oleh *software Design Expert 7*. Verifikasi dianalisis menggunakan uji *one sample t-test*.

8. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri terhadap sediaan gel hand sanitizer ekstrak daun kersen menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram. Adapun langkah kerja uji aktivitas antibakteri dapat dilihat dibawah ini :

a. Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat dan bahan yang akan digunakan dicuci, dibungkus, disemprot alkohol 70%, dan disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas seperti cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, pipet volume dimasukkan ke dalam oven (pemanasan kering) dan disterilkan pada suhu 171°C selama 1 jam. Untuk alat tabung reaksi dan lobang erlenmeyer ditutup menggunakan kapas agar terhindar dari kontaminasi setelah dikeluarkan dari oven. Alat dan bahan yang tidak tahan pemanasan kering seperti media, tips dimasukkan dalam autoclave (pemanasan basah) pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. Pembuatan media

1) Media peremajaan bakteri

Media yang digunakan untuk peremajaan bakteri yaitu *Nutrient Agar* (NA), dengan cara melarutkan 1 gram NA dalam 50 ml akuades menggunakan Erlenmeyer yang dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian media dituangkan ke dalam tabung reaksi. Lubang tabung reaksi ditutup dengan kain kasa dan dibungkus *aluminium foil*. Setelah itu media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian ditunggu hingga media memadat dengan kemiringan 30° (Herliana, *et al.*, 2020).

2) Media untuk uji aktivitas antibakteri

Media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu *Mueller-Hinton Agar* (MHA). Sebanyak 3,8 gram MHA dalam 100 ml akuades menggunakan Erlenmeyer yang dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Lubang erlenmeyer ditutup menggunakan kain kasa dan dibungkus menggunakan *aluminium foil*. Kemudian sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya media dituangkan ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga media memadat (Herliana, *et al.*, 2020).

c. Pembuatan larutan standar Mc Farland 0,5

Larutan McFarland 0,5 ($1,6 \times 10^8$ CFU/mL) dibuat dengan melarutkan larutan 0,05 mL BaCl₂ 1,175% dengan 9,95 mL larutan asam sulfat pekat. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan keruh yang akan dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji. Estimasi jumlah bakteri adalah sebanyak $1,6 \times 10^8$ CFU/ML (Herliana, *et al.*, 2020).

d. Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasikan dalam media *Nutrient Agar* miring. Media yang sudah diinokulasi selanjutnya disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

e. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

1 ujung ose koloni bakteri diambil dari hasil peremajaan. Setelah itu koloni bakteri disuspensikan ke dalam 9 ml larutan NaCl fisiologis (NaCl fisiologis 0,9%). Kemudian hasil suspensi disetarakan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5.

f. Uji daya hambat metode difusi kertas cakram terhadap sediaan gel hand sanitizer

Sebanyak 0,1 ml bakteri uji diinokulasikan pada medium MHA dan diratakan menggunakan batang L. Setelah itu, kertas cakram dicelupkan hingga jenuh selama 5 menit pada gel ekstrak daun kersen. Kemudian kertas cakram tersebut diletakkan di atas media secara aseptis. Cawan petri ditutup dan media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Setelah itu diameter zona hambat diamati dan diukur menggunakan jangka sorong. Kontrol positif yaitu gel *hand sanitizer* Nuvo (P1) dan kloramfenikol (P5), kontrol negatif yaitu akuades (P3) dan basis gel (P4). P2 sebagai sampel gel *hand sanitizer*.