BAB III
METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental. Penelitian ini menggunakan daun kersen (*Muntingia calabura* L.) untuk mengetahui bagaimana pengaruh variasi konsentrasi ekstrak daun kersen terhadap sifat fisik dan aktivitas antibakteri krim terhadap *Staphylococcus aureus*.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli-Agustus 2023.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

   Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kersen dalam krim.
2. Variabel terikat

   Sifat fisik krim (daya lekat, pH, viskositas, dan daya sebar) dan diameter hambat bakteri.
3. Variabel terkendali

   Suhu pengeringan simplisia, suhu peleburan, kecepatan pengadukan krim, dan waktu perendaman kertas cakram.

D. Definisi Operasional

1. Variasi konsentrasi ekstrak daun kersen yang digunakan dalam krim yaitu 1; 1,25; dan 1,5 % b/v.
2. Diameter zona hambat *Staphylococcus aureus* diukur secara horizontal, vertikal dan diagonal menggunakan jangka sorong dengan satuan millimeter (mm).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PERPUSTAKAAN
YOGYAKARTA

3. Karakterisasi sifat fisik krim meliputi : uji homogenitas krim, uji daya sebar, uji pH, uji viskositas, uji organoleptis, uji daya lekat, dan uji tipe krim.

E. Alat dan Bahan

1. Alat
   a. Tahap ekstraksi daun kersen dan karakterisasi ekstrak daun kersen

      Alat yang digunakan yaitu oven (Memmert IN60), grinder (Fomac), timbangan analitik (Ohaus PX224/E), kompor (Maspion S-301), *hot plate* (IKA C-MAG HS 7), *alumunium foil*, toples, ayakan 40 mesh, *centrifuge* (Hettich EBA), erlenmeyer (pyrex), tabung reaksi (pyrex), pipet ukur dan rak tabung, gelas beker (pyrex), gelas ukur (pyrex), batang pengaduk, spatula, gelas arloji, kertas saring, gelas objek, dan *magnetic stirrer*.

   b. Tahap formulasi sediaan krim ekstrak daun kersen dan evaluasi sifat fisik

      Alat yang digunakan yaitu *moisture analyzer* (Ohaus MB90), Homogenizer (IKA T25), sonikator (cole parmer), pH meter (Hanna), *viscometer (Brookfield* DV1), *centrifuge* (Hettich EBA), mikroskop, erlenmeyer (pyrex), tabung reaksi (pyrex), pipet ukur, gelas beker (pyrex), gelas ukur (pyrex), batang pengaduk, tabung sentrifugasi, cawan porselin, cawan petri, gelas arloji, dan objek glass.

   c. Tahap uji aktivitas antibakteri

      Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu *Biological Safety Cabinet* (Daihan LabTech), Spektrofotometer UV-Vis *(genesis 10S UV-VIS)*, inkubator (Memmert IN30), autoklaf (GEA), oven (Memmert IN160), cawan petri, vortex, jangka sorong, spidol, bunsen, erlenmeyer (pyrex), tabung reaksi (pyrex), pipet ukur dan rak tabung, beker glass (pyrex), jarum ose, batang L, pinset, alumunium foil, dan mikropipet (DLab).

2. Bahan
   a. Tahap ekstraksi daun kersen dan karakterisasi ekstrak daun kersen

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI PERPUSTAKAAN YOGYAKARTA

Bahan yang digunakan yaitu daun kersen, etanol 70 % (teknis), reagen Dragendroff (p.a), reagen Meyer (p.a), reagen Bouchardat (wagner) (p.a), HCl pekat (p.a), H_2SO_4 (p.a), kloroform, metilen biru (teknis), serbuk Mg (p.a), dan $FeCl_3$ 1% (p.a), akuades.

b. Bahan formulasi sediaan krim ekstrak daun kersen dan evaluasi sifat fisik

Bahan yang digunakan yaitu cera alba (teknis), asam stearat (teknis), TEA atau *Triethanolamin* (teknis), vaselin flavum (teknis), propilenglikol (teknis), dan akuades.

c. Bahan uji aktivitas antibakteri

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas yaitu *Nutrient Agar* (NA), etanol 70 % (teknis), *Mueller Hinton Agar* (MHA), bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, $BaCl_2$ 1% (p.a), kertas cakram (Oxoid), aluminium foil, *blue tip*, dan asam sulfat 1% (p.a).

F. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan sampel

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dipetik pada pagi hari di Desa Gamping, Kecamatan Nogotirto, Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Daun kersen yang diambil berupa daun yang segar pada urutan ke-3, 4, dan 5 daun dari pucuk dengan lebar 4 cm dan panjang ± 13-15 cm, terbebas dari hama, daun yang tidak terlalu tua dan daun yang tidak terlalu muda. Selanjutnya daun kersen disortasi basah. Sampel daun kersen dikering anginkan dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50ºC. Daun kersen kering kemudian dihaluskan dengan blender hingga diperoleh serbuk. Selanjutnya serbuk simplisia diayak menggunakan ayakan 40 mesh (Purwanti *et al.*, 2018).

2. Determinasi tanaman daun kersen

Determinasi daun kersen dilakukan untuk memastikan keaslian daun kersen yang dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.

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

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

Sebanyak 1 kg daun kersen dimaserasi dengan etanol 70% sebanyak 10 L (1:10) hingga simplisia terendam seluruhnya. Wadah maserasi ditutup rapat, maserasi dilakukan selama 3x24 jam dan diaduk tiga kali sehari selama 5 menit. Maserat disimpan di tempat yang gelap. Hasil maserasi disaring dan didapatkan filtrat. Selanjutnya filtrat dipekatkan pada suhu 45ºC hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak kental daun kersen dihitung menggunakan persamaan 1 (Depkes RI, 2000).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\% \quad \ldots\ldots(1)$$

4. Karakterisasi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.)
   a. Uji organoleptis

      Pengamatan dilakukan terhadap aroma, warna, hingga bentuk dari daun kersen (Setiawan *et al*., 2022).
   b. Uji pH

      Sebanyak 1 g ekstrak daun kersen dilarutkan dalam 10 ml akuades. Ekstrak daun kersen diukur menggunakan pH meter (Azkiya *et al.*, 2017).
   c. Penetapan kadar air

      Sebanyak 1 gram ekstrak daun kersen ditimbang, kemudian dipanaskan pada suhu 105ºC dalam *moisture analyzer*. Nilai kadar air yang tertera dicatat (Hanif *et al.*, 2018).
   d. Skrining fitokimia
      1) Identifikasi alkaloid

         Sebanyak 0,5 g ekstrak daun kersen dicampur dengan asam klorida 2N 1 ml dan air sebanyak 9 ml. Lalu selama 2 menit, larutan dipanaskan di atas penangas air kemudian dibiarkan dingin dan disaring. Sebanyak 3 tetes filtrat dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi. Sebanyak 2 tetes larutan reagen Meyer, Bouchardat (Wagner) dan Dragendorff ditambahkan ke masing-masing tabung reaksi. Sampel mengandung alkaloid jika penambahan larutan pereaksi

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

Meyer ke dalam tabung reaksi menghasilkan endapan putih atau kuning, jika penambahan pereaksi Bouchardat membentuk endapan berwarna coklat sampai hitam dan jika penambahan pereaksi Dragendorff membentuk endapan berwarna kuning-orange. Apabila 2 dari 3 reaksi menunjukkan positif alkaloid, larutan dianggap mengandung alkaloid (Syahara dan Siregar, 2019).

2) Identifikasi flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam etanol 96%. Sebanyak 0,5 gram serbuk logam magnesium dan 10 ml HCl pekat ditambahkan ke dalam ekstrak daun kersen. Warna merah muda atau ungu pada hasil reaksi menunjukkan adanya positif flavonoid (Syahara dan Siregar, 2019).

3) Identifikasi terpenoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak daun kersen dilarutkan menggunakan kloroform. Melalui dinding tabung reaksi, dimasukkan 2 ml H_2SO_4 pekat dan 0,5 ml asam asetat anhidrat. Cincin kecoklatan yang terbentuk pada batas larutan dapat menunjukkan adanya terpenoid (Zebua *et al.*, 2019).

4) Identifikasi steroid

Sebanyak 0,5 g ekstrak daun kersen dilarutkan dalam 5 ml eter. Selanjutnya campuran ini dibiarkan selama 2 jam dan akan disaring. Hasil filtrat penyarian 2 ml diuapkan kedalam cawan porselin, kemudian ditambahkan asam asetat anhidrat sebanyak 1 ml dan diikuti penambahan asam sulfat pekat sebanyak 2-3 tetes melalui dinding tabung. Adanya steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman (Syahara dan Siregar, 2019).

5) Identifikasi saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun kersen dilarutkan dalam 10 ml air panas ke dalam tabung reaksi. Campuran dibiarkan hingga dingin dan dikocok hingga kuat dalam 10 detik. Sebanyak 1 tetes HCl 2 N

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PERPUSTAKAAN
YOGYAKARTA

ditambahkan. Adanya saponin ditandai dengan tinggi busa 1-10 cm yang stabil selama 10 menit (Syahara dan Siregar, 2019).

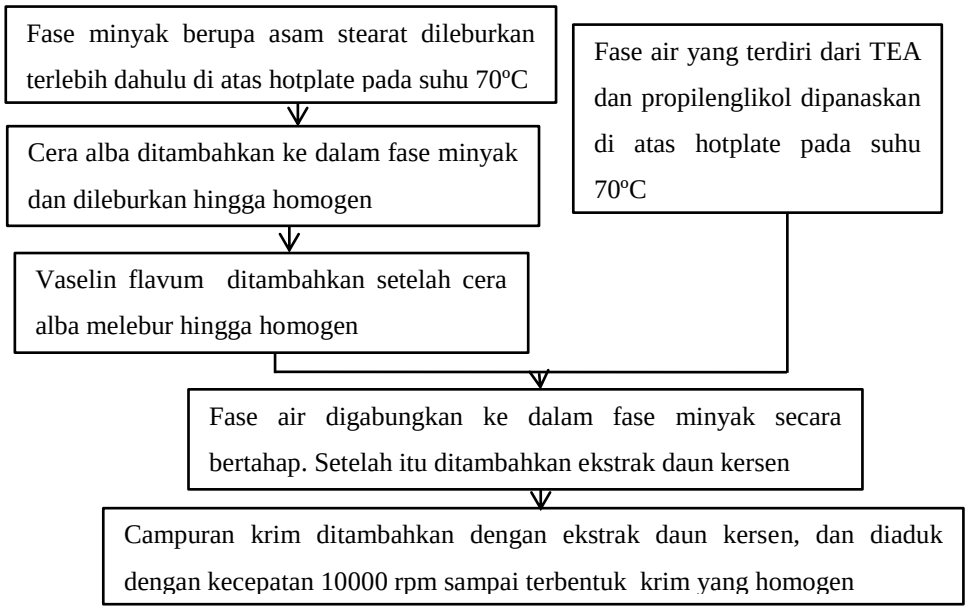
5. Formulasi krim ekstrak daun kersen

Tabel 3. Formula sediaan krim ekstrak etanol daun kersen (Setiawan *et al*., 2022)

Bahan	Kegunaan	Konsentrasi (%b/v)			
		Formula 0	Formula 1	Formula 2	Formula 3
Ekstrak daun kersen	Zat aktif	-	1	1,25	1,5
Cera alba	Emulgator	2	2	2	2
Asam stearate	Emulgator	10	10	10	10
TEA	Emulgator	1,5	1,5	1,5	1,5
Vaselin flavum	Emolient	8	8	8	8
Propilen glikol	Humektan	8	8	8	8
Akuades	Pelarut	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Formula ini mengacu pada penelitian Setiawan dkk (2022), namun terjadi modifikasi dilakukan pada konsenstrasi asam stearat dan zat aktif yang digunakan. Penelitian ini membuat 4 formula yang terdiri dari 1 basis krim dan 3 formula krim yang mengandung ekstrak dengan konsentrasi yang berbeda. Variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan mengacu pada penelitian Manik dkk (2014) dengan nilai KBM ekstrak daun kersen adalah 0,125%. Bobot total krim yang dibuat yaitu 100 g. Variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 1% (8 kali KBM), 1,25% (10 kali KBM), dan 1,5% (12 kali KBM). Adapun formula yang digunakan dapat dilihat pada tabel 3 dan prosedur pembuatan krim dapat dilihat pada Gambar 7.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI PERPUSTAKAAN YOGYAKARTA



Gambar 7. Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak Daun Kersen

6. Evaluasi sifat fisik krim ekstrak daun kersen
   a. Uji organoleptis

      Pengujian dilakukan dengan mengamati bau, bentuk, dan warna dari sediaan krim (Setiawan *et al*., 2022).

   b. Uji daya sebar

      Sebanyak 0,5 gram krim diletakkan di atas permukaan cawan petri yang sebelumnya cawan petri telah ditimbang terlebih dahulu. Kemudian cawan petri ditimpa dengan cawan petri lainnya secara bertahap dengan beban seberat 50 gram hingga mencapai 200 gram secara bergantian, ditunggu 1 menit. Setelah itu diameter sebar krim diukur secara sisi horizontal, diagonal, dan vertikal. Ketentuan diameter sebar yang bagus 5-7 cm (Setiawan *et al.*, 2022).

   c. Uji daya lekat

      Sebanyak 0,5 gram krim diletakkan di atas objek glass kemudian ditutup menggunakan gelas objek lainnya. Beban 1 kg diatasnya dan didiamkan selama 5 menit. Kemudian tuas ditarik dan beban seberat 80 gram dilepaskan. Waktu dicatat hingga kedua gelas objek tersebut terpisah. Ketentuan waktu lekat yang bagus adalah >4 detik (Setiawan *et al*., 2022).

   d. Uji homogenitas

      Sediaan krim dioleskan sedikit pada objek glass. Kemudian pengamatan dilakukan terkait ada tidaknya partikel yang terbentuk atau ketidakhomogenan partikel krim yang dapat dilihat pada gelas objek (Setiawan *et al.*, 2022).

   e. Uji stabilitas krim

      Sebanyak 5 gram krim dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Lalu krim disentrifugasi selama 5 jam dalam suhu ruang dengan kecepatan 3750 rpm. Apabila tidak menunjukkan pemisahan fase setelah disentrifugasi maka krim termasuk emulsi yang stabil. Pengujian ini setara dengan penyimpanan krim pada suhu ruang

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PERPUSTAKAAN
YOGYAKARTA

selama 1 tahun (Lachman *et al.*, 1987). Uji stabilitas krim dapat dihitung menggunakan persamaan 2.

$$F=\frac{Hu}{Ho} \quad \text{.....} (2)$$

Keterangan :
Ho = tinggi emulsi awal
Hu = tinggi emulsi yang stabil pada waktu pengamatan
F = rasio pemisahan fase emulsi

f. Uji determinasi tipe krim

1) Metode pengenceran

Sediaan krim dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditambahkan air 30 ml. Apabila sediaan krim dapat diencerkan maka krim termasuk tipe M/A sedangkan jika krim tidak bisa diencerkan maka termasuk tipe A/M (Pratasik *et al.*, 2019).

2) Metode pewarnaan

Sebanyak 1 tetes krim diletakkan pada gelas objek, ditambahkan 2-3 tetes metilen biru, dan diamati di bawah mikroskop. Tipe emulsi merupakan M/A apabila emulsi terwarnai oleh metilen biru (Pratasik *et al.*, 2019).

g. Uji pH

Sebanyak 1 g krim dilarutkan dengan 10 ml akuades. Elektroda dicelupkan ke dalam *beaker glass* hingga dihasilkan nilai yang konstan (Azkiya *et al.*, 2017).

h. Uji viskositas

Sebanyak 0,2 gram krim dimasukkan ke dalam beaker glass. Spindel ukuran 6 dipasang, setelah itu dijalankan rotor pada kecepatan 10 rpm. Hasil viskositas dicatat. Nilai kekentalan krim yang ideal adalah 2000-50.000 cPs (Setiawan *et al.*, 2022).

7. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kersen dan sediaan krim ekstrak daun kersen dengan metode difusi cakram

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Sterilisasi alat dilakukan untuk pengujian aktivitas antibakteri. Alat-alat seperti *beaker glass*, tabung reaksi, batang L, dan cawan petri dicuci dengan akuades untuk menghindari terjadinya kontaminasi, dan dilap menggunakan tisu. Di dalam oven, alat-alat yang telah dibungkus kertas payung disterilisasi pada suhu 170ºC selama 1 jam (Setiawan *et al*., 2022).

Sterilisasi bahan-bahan seperti NaCl 0,9%, *blue tip*, akuades, media peremajaan bakteri dan media uji dilakukan agar menghindari terjadinya kontaminasi. Bahan-bahan disterilisasi selama 15 menit menggunakan autoklaf pada suhu 121ºC.

b. Pembuatan Media

Nutrient Agar (NA) merupakan media yang digunakan dalam peremajaan bakteri. Dalam labu Erlenmeyer, sebanyak 1,2 gr *Nutrient agar* dicampurkan dengan 250 ml akuades steril. Campuran tersebut lalu dipanaskan di atas *hot plate* ± 10 menit sampai campuran larut. Selanjutnya media NA dituangkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, dan dimiringkan hingga media tersebut memadat (Setiawan *et al*., 2022).

*Mueller Hinton Agar (*MHA) merupakan suatu media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Sebanyak 10,54 gram media MHA ditimbang dan dilarutkan dalam 1000 mL akuades. Di atas *hot plate*, media dipanaskan hingga mendidih sampai larut. Media MHA disterilisasi selama 15 menit dengan autoklaf pada suhu 121ºC. Media MHA dituangkan ke dalam cawan petri yang telah disterilisasikan, selanjutnya dalam suhu kamar media dibalik dan dibiarkan memadat (Utomo *et al.*, 2018).

c. Pembuatan larutan standar *McFarland* 0,5

Larutan yang digunakan sebagai pembanding terhadap kekeruhan biakan bakteri dengan kepadatan jumlah sel sekitar 1,5 x 10^8 CFU/ml adalah larutan standar *McFarland* 0,5. Prosedur kerja pembuatan larutan *McFarland* yaitu sebanyak 0,05 ml $BaCl_2$ 1%

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PERPUSTAKAAN
YOGYAKARTA

ditambahkan 9,95 ml H_2SO_4 1%. Larutan standar *McFarlad* diukur absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm dan penentuan kepekatan suspensi bakteri untuk mengetahui bahwa larutan standar tersebut memiliki nilai absorbansi 0,08-0,1. Jika hasil yang diperoleh tidak memenuhi syarat maka dilakukan pengenceran dengan akuades dan diukur kembali dengan spektrofotometer UV-Vis sampai memenuhi syarat. Larutan *McFarland* disimpan dari jangkauan sinar matahari (Sarosa *et al*., 2018).

d. Peremajaan bakteri

Bakteri hasil isolat diambil dan digoreskan pada media NA menggunakan jarum ose bulat yang sudah disterilkan. Media diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37ºC hingga bakteri berhasil diremajakan (Suherman *et al*., 2018).

e. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri yang telah diremajakan diambil sejumlah 1 ose kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi dengan 2 ml larutan NaCl 0,9%. Setelah itu suspensi tersebut divortex hingga homogen. Kekeruhan dibandingkan dengan standar *McFarland* 0,5 (Mpila *et al.*, 2012).

f. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kersen dengan metode difusi cakram

Larutan uji dibuat dengan variasi konsentrasi masing-masing 1; 1,25; dan 1,5 % b/v ekstrak daun kersen. Masing-masing larutan uji dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 100 ml sampai tanda batas (Wangkanusa *et al*., 2016). Sebanyak 0,1 ml atau 100 µl suspensi bakteri diambil sambil didekatkan pada bunsen. Kemudian suspensi bakteri dituangkan ke dalam cawan petri yang sudah berisi media MHA dengan metode *spread plate* yaitu dengan cara meratakan bakteri menggunakan batang L hingga merata ke seluruh media. Selama 5 menit, kertas cakram direndam dalam masing-masing larutan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

ekstrak daun kersen. Setiap kertas cakram diletakkan pada cawan petri dengan diberi jarak. Kontrol positif menggunakan antibiotik kloramfenikol dan kontrol negatifnya menggunakan akuades. Selanjutnya media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC. Dengan menggunakan jangka sorong, diameter zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur secara horizontal, diagonal dan vertikal.

g. Uji aktivitas antibakteri sediaan krim ekstrak daun kersen dengan metode difusi cakram

Sebanyak 0,1 ml atau 100 µl suspensi bakteri diambil sambil didekatkan pada bunsen. Kemudian suspensi bakteri dituangkan ke dalam cawan petri yang sudah berisi media MHA dengan *metode spread plate* yaitu dengan cara meratakan bakteri menggunakan batang L hingga merata keseluruh media. Selama 5 menit, kertas cakram direndam dalam masing-masing sediaan krim ekstrak daun kersen. Setiap kertas cakram diletakkan dengan diberi jarak. Kontrol positif menggunakan sediaan krim komersil berupa krim kloramfenikol® dan kontrol negatifnya menggunakan basis krim. Selanjutnya media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC. Dengan menggunakan jangka sorong, diameter zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur secara horizontal, diagonal dan vertikal. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan 3 kali replikasi (Setiawan *et al*., 2022).

Aktivitas antibakteri dihitung zona hambatnya menggunakan penggaris atau jangka sorong yang sesuai pada tiga sisi yaitu horizontal, vertikal, dan diagonal. Zona hambat yang diperoleh dihitung rata-ratanya kemudian ditentukan kekuatan antibakterinya.

G. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Perhitungan diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus*

Menurut Winastri dkk (2020), pengamatan dilakukan terhadap zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan rumus yang dapat dilihat pada persamaan 3.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

$$DH = \frac{Dh + Dv + Dd}{3} \quad \text{.....(3)}$$

Keterangan :
DH = Diameter zona hambat
Dh = Diameter horizontal
Dv = Diameter vertikal
Dd = Diameter diagonal

2. Analisis Data

Data sifat fisik (pH, daya sebar, daya lekat, dan viskositas) dan diameter zona hambat yang diperoleh dianalisis normalitas dan homogenitas. Normalitas data dianalisis menggunakan uji *Saphiro Wilk* karena data kurang dari 50. Sedangkan homogenitas data dianalisis menggunakan metode *Leven's of Homogenity of Variance.* Data yang normal dan terdistribusi homogen dianalisis dengan menggunakan *One Way ANOVA* dan diuji post hoc dengan *Tukey.* Namun data yang tidak homogen atau tidak normal maka analisis dilakukan menggunakan *Kruskal Wallis*, serta dilanjutkan dengan uji post hoc dengan *Pairwise comparisons.* Untuk melihat perbedaan zona hambat antara ekstrak daun kersen dengan sediaan krim ekstrak daun kersen dilakukan dengan uji T independent (data yang terdistribusi normal dan homogen).

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA