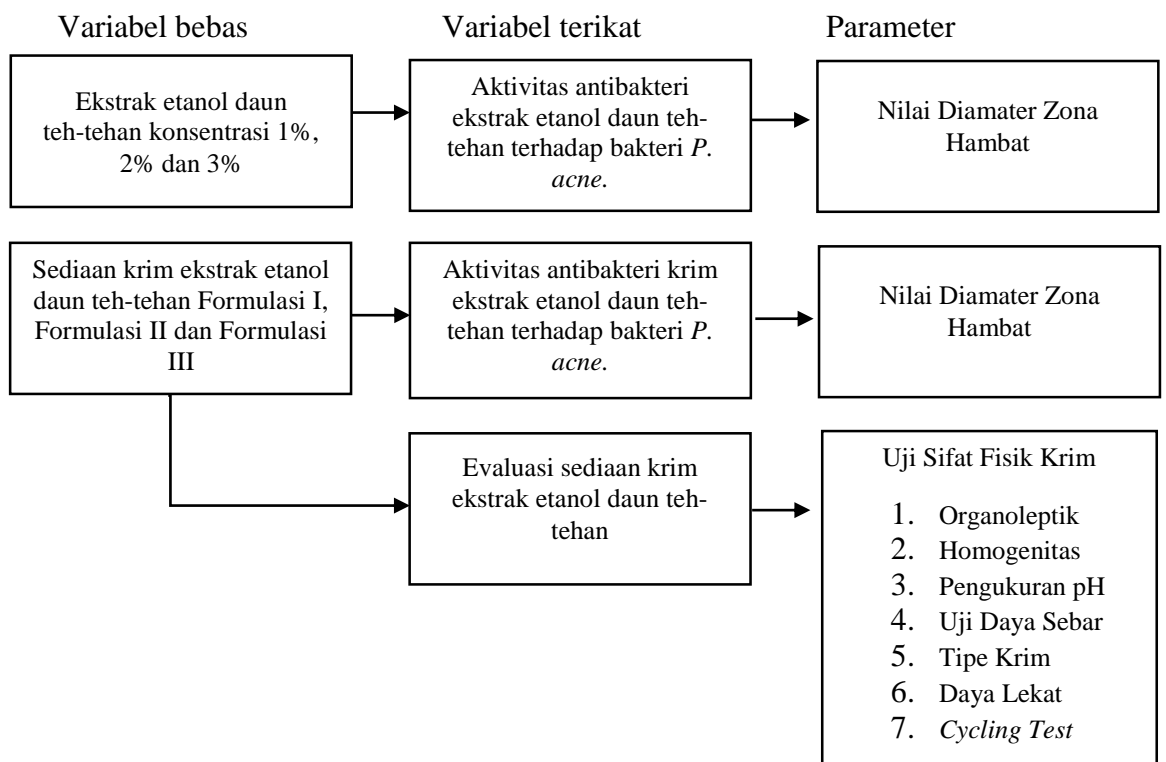


### BAB III METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan metode penyajian data deskriptif kuantitatif formulasi sediaan krim ekstrak etanol daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) dan evaluasi uji fisik sediaan krim (meliputi uji homogenitas, uji pH, uji tipe emulsi, uji daya sebar, organoleptik, daya lekat dan *Cycling Test*) serta aktivitas antibakteri sediaan krim ekstrak etanol daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) dengan sediaan krim pembanding (Mediklin Krim) terhadap bakteri *P. acne* dengan metode difusi agar, untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang ditandai dengan adanya zona hambat atau zona bening di sekitar kertas cakram. Hasil data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar dan dilakukan analisis data menggunakan uji *One Way ANOVA*.

#### B. Variabel Penelitian



**Gambar 3.1 Variabel penelitian**

### **C. Tempat dan Waktu Kegiatan**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium STIKES IBNU SINA AJIBARANG yang dimulai bulan Desember 2021 sampai dengan bulan Agustus 2022.

### **D. Alat dan Bahan**

#### 1. Alat

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Autoklaf* (GEA Medika), batang pengaduk, bunsen, cawan porselin, cawan petri (HERMA), corong (HERMA), erlenmeyer (HERMA), tabung reaksi (*Pyrex*), inkubator (*B-ONE*), jangka sorong (*Taffware*), mortir dan stamper, oven, kertas saring, *Laminar Air Flow* (*Messgerate*), neraca analitik (*Matrix*), beker gelas (*Pyrex*), gelas ukur (HERMA), ose bulat, pH universal, pipet tetes, pinset, sudip, sendok tanduk, spatula, toples kaca, wadah krim, aluminium foil, tissue, plastik wrap, *spektrofotometri UV-Vis* (D-LAB), kaca arloji, *objek glass* (*Sail Brand*), plat kaca, *Mikropipet* (*Accumax Pro*), *yellowtip*, rak tabung, penjepit kayu dan *Waterbath* (*Faithful*).

#### 2. Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*), bakteri *P. acne*, etanol 70%, asam stearat, setil alkohol, trietanolamin, aquadest, gliserin, nipagin, *nutrient agar* (NA), DMSO (Dimetil sulfoksida) dan Krim klindamisin (Medi-Klin krim).

### **E. Langkah kerja**

#### 1. Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil yaitu daun keempat dan kelima dari pucuk (Rohmatika, 2019). Pengambilan sampel dilakukan di Desa Tumanggal, Kecamatan Pengadegan, Kabupaten Purbalingga.

## 2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bertujuan untuk memastikan bahwa simplisia yang digunakan untuk penelitian adalah daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) di determinasi di Laboratorium Lingkungan, Fakultas Biologi, Universitas Jendral Soedirman, Purwokerto.

## 3. Preparasi sampel

Daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) yang diperoleh dari Desa Tumanggal, Kecamatan Pengadegan, Kabupaten Purbalingga ditimbang sebanyak 2 kg, sampel dicuci dan dibersihkan menggunakan air mengalir agar kotoran yang terdapat pada daun hilang, ditiriskan, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari langsung dengan ditutupi kain berwarna hitam. Proses pengeringan dilakukan selama 4-5 hari atau dalam lemari pengering dengan suhu 50°C. Setelah sampel kering, dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan menggunakan ayakan mesh no 40 sehingga mendapatkan serbuk halus daun teh-tehan, kemudian ditimbang berat keringnya (Adhi, 2020).

## 4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Teh-tehan (*Acalypha siamensis*) Menggunakan Metode Maserasi

Pembuatan ekstrak etanol daun teh-tehan dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% (Hutagalung, 2019). Serbuk simplisia daun teh-tehan sebanyak 200 gram direndam dalam 1400 ml pelarut etanol 70% selama 3 hari disertai pengadukan sebanyak 2 kali dalam sehari. Hasil perendaman selama 3 hari tersebut kemudian dilanjutkan dengan penyaringan. Maserat yang diperoleh dikumpulkan dan disimpan terlebih dahulu, sedangkan ampasnya dilakukan remaserasi dengan 600 ml pelarut etanol 70% selama 2 hari. Setelah 2 hari, dilakukan penyaringan dan maserat yang diperoleh digabungkan dengan maserat sebelumnya (Mulangsri *et al.*, 2021). Seluruh maserat digabung dan dipisahkan dengan alat *rotary evaporator* pada temperatur tidak lebih dari 40°C atau dengan penangas air (*water bath*) pada temperatur 90°C sambil diaduk hingga diperoleh ekstrak kental daun teh-tehan (Hutagalung, 2019).

## 5. Uji Aktivitas Antibakteri

### a. Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu, dicuci bersih dan dikeringkan. Alat-alat gelas seperti gelas ukur, beker glass, tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup lubangnya dengan sumbat kapas yang dibalut dengan kain kasa steril lalu dibungkus. Kemudian semuanya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. *Laminar air flow* disterilkan dengan cara dibersihkan dari debu lalu disemprot dengan etanol 70%. Jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran dengan melewatkannya pada nyala api selama 20 detik (Rusli, 2017).

### b. Pembuatan Media Agar

Sebanyak 20 gram *Nutrien Agar* dilarutkan dalam 1000 ml aquades steril, kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hotplate* hingga mendidih. Media yang sudah tersuspensi sempurna disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang sudah steril kemudian dituang dalam kondisi hangat kedalam cawan petri dibiarkan sampai memadat (Wigunarti *et al.*, 2019).

### c. Persiapan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Untuk kontrol positif menggunakan Klindamisin, dan untuk kontrol negatif menggunakan basis krim.

### d. Proses Peremajaan Bakteri

Bakteri uji ditumbuhkan pada medium *Nutrien Agar* (NA) dengan cara menggoreskan bakteri dari biakan murni menggunakan jarum ose pada permukaan agar. Bakteri yang sudah digoreskan pada media kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk bakteri *P. acnes* (Saraswati, 2015).

### e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Koloni bakteri uji yang diremajakan diambil dengan jarum ose, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diisi aquades steril. Pengenceran dibuat dan diukur kekeruhan dari suspensi

menggunakan *spektrofotometri UV-Vis* sampai diperoleh bakteri dengan nilai absorbansi 0,1 pada panjang gelombang 600nm (Cahyani, 2018).

f. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Teh-tehan Terhadap *Propionibacterium acne*

1) Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Teh-tehan Terhadap *Propionibacterium acne*

Penentuan konsentrasi ditentukan dari konsentrasi ekstrak 1%, 2% dan 3%. Ekstrak yang sudah dimaserasi kemudian dilarutkan di dalam DMSO pada konsentrasi yang sudah ditentukan. Pada konsentrasi 1% dengan cara menambahkan 0,01 gram ekstrak + 1 ml DMSO, konsentrasi 2% dengan cara menambahkan 0,02 gram ekstrak + 1 ml DMSO, konsentrasi 3% dengan cara menambahkan 0,03 gram ekstrak + 1 ml DMSO (Anggia *et al.*, 2019).

Pengujian ekstrak daun teh-tehan terhadap pertumbuhan bakteri *P. acne* dilakukan dengan menggunakan kertas cakram berdiameter 6 mm. Suspensi mikroba uji dengan absorbansi 0,1 diambil sebanyak 20  $\mu$ L dan ditambahkan pada media agar 10 mL yang telah disterilkan dan divortex hingga homogen. Selanjutnya dituang pada masing-masing cawan petri steril kemudian digoyang-goyangkan sampai merata dan didiamkan hingga memadat. Cawan petri yang telah berisi media yang mengandung mikroba uji ditambahkan cakram kertas yang masing-masing sudah berisi larutan uji masing-masing sebanyak 20  $\mu$ L. Larutan uji tersebut adalah kontrol negatif (DMSO), kontrol positif (Mediklin) dan larutan ekstrak yang dibuat dengan diencerkan menjadi masing-masing konsentrasi 1%, 2% dan 3%. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, zona jernih yang terbentuk diamati. Diameter zona diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam mm.

Replikasi dilakukan tiga kali untuk masing-masing mikroba uji (Cahyani, 2018).

2) Uji Aktivitas Antibakteri Krim Ekstrak Etanol Daun Teh-tehan Terhadap *Propionibacterium acne*

Pembuatan larutan uji sediaan krim diambil sebanyak 1 gram krim ekstrak etanol daun teh-tehan dengan berbagai konsentrasi dan juga kontrol positif ditimbang, masing-masing krim dilarutkan dengan aquadest lalu dicukupkan volume total hingga 1 ml (Hutagalung, 2019).

Pengujian krim ekstrak daun teh-tehan terhadap pertumbuhan bakteri *P. acne* dilakukan dengan menggunakan kertas cakram berdiameter 6 mm. Suspensi mikroba uji dengan absorbansi 0,1 diambil sebanyak 20  $\mu$ L dan ditambahkan pada media agar 10 ml yang telah disterilkan dan divortex hingga homogen. Selanjutnya dituang pada masing-masing cawan petri steril kemudian digoyang-goyangkan sampai merata dan didiamkan hingga memadat. Cawan petri yang telah berisi media yang mengandung mikroba uji ditambahkan cakram kertas yang masing-masing sudah berisi larutan uji masing-masing sebanyak 20  $\mu$ L. Larutan uji tersebut adalah formulasi 0 ; I ; II ; III dan kontrol positif. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, zona jernih yang terbentuk diamati. Diameter zona diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam mm. Replikasi dilakukan tiga kali untuk masing-masing mikroba uji (Cahyani, 2018).

6. Pembuatan Sediaan krim

Formulasi sediaan krim ekstrak daun teh-tehan menggunakan tipe minyak dalam air (Tabel 3.1). Bahan-bahan fase minyak terdiri dari asam stearat dan setil alkohol. Untuk fase air terdiri dari trietanolamin, gliserin dan nipagin. Pembuatan krim dilakukan dengan cara meleburkan fase minyak dan melarutkan fase air di atas *hotplate* pada suhu 60-70°C. Fase

minyak dituang kedalam mortir di gerus sampai homogen. Selanjutnya, fase air ditambahkan sedikit demi sedikit di gerus perlahan sampai membentuk massa krim. Apabila suhu krim sudah mencapai suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ , kemudian ditambahkan ekstrak daun teh-tehan dalam basis krim dan digerus sampai homogen setelah itu krim dimasukkan kedalam wadah (Aimana, 2021). Dalam penelitian ini kontrol positif menggunakan krim yang mengandung klindamisin (Tabel 3.2).

**Tabel 3.1 Formulasi krim Ekstrak Etanol Daun Teh-tehan (*Acalypha siamensis*)**

Bahan	Formulasi 0 (g)	Formulasi I (g)	Formulasi II (g)	Formulasi III (g)
Ekstrak	0	1	2	3
Asam stearat	12	12	12	12
Setil alcohol	2	2	2	2
Gliserin	8	8	8	8
TEA	3	3	3	3
Nipagin	0,2	0,2	0,2	0,2
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

**Tabel 3.2 Kontrol positif krim klindamisin**

Kategori	Keterangan
Merek	Medi-Klin Krim 15gr
Kandungan	<i>Clindamycin phosphate</i>
Indikasi	<i>Acne Vulgaris</i>

## 7. Evaluasi fisik sediaan krim

Pengujian stabilitas sediaan krim ekstrak daun Teh-tehan menggunakan beberapa jenis pengujian yang merupakan persyaratan kelayakan sediaan krim diantaranya adalah (Suru *et al.*, 2019)

### a. Organoleptis

Pengujian organoleptik dilakukan dengan mengamati bentuk krim, warna dan bau krim (Aimana, 2021).

### b. Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara krim ditimbang sebanyak 0,1 gram kemudian dioleskan pada sekeping kaca transparan

kemudian diamati. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar (Aimana, 2021).

c. pH

Pengukuran pH menggunakan pH meter. Rentang toleransi pH krim berkisar antara 4.0 – 7.5 (Adhi, 2020).

d. Daya sebar

Sebanyak 0,5 gram krim diletakkan ditengah cawan petri yang berada dalam posisi terbalik. Beri beban cawan petri yang lain diatas krim lalu diamkan selama 1 menit. Tambahkan 50 gram beban lalu ukur diameternya, standar daya sebar krim yaitu 5 cm - 7 cm (Safitri and Zaky, 2016).

e. Tipe krim

Uji tipe emulsi menggunakan metode pengenceran. Krim yang telah dibuat dimasukkan kedalam gelas kimia kemudian diencerkan dengan aquadest, jika emulsi tidak tercampur dengan air maka tipe emulsinya A/M, jika tercampur dengan air maka tipe emulsinya M/A (Suru *et al.*, 2019).

f. Uji daya lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan cara 0,5 gram krim diletakkan diatas dua gelas objek yang telah ditentukan, kemudian ditekan dengan beban 250 gram selama 5 menit. Setelah itu dipasang objek gelas pada alat uji lalu ditambahkan beban 80 gram pada alat uji. Kemudian dicatat waktu yang dibutuhkan beban tersebut untuk memisahkan kedua kaca tersebut (Suru *et al.*, 2019). Semakin lama suatu sediaan menempel pada kulit maka absorbsinya pada kulit akan semakin baik. Lama waktu dihitung hingga objek gelas terlepas. Rentang nilai daya lekat sediaan yang baik adalah lebih dari satu detik (Erwiyani *et al.*, 2021).

g. *Cycling Test*

*Cycling Test* dilakukan dengan cara sediaan krim disimpan pada suhu dingin  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ , proses ini dihitung 1 siklus. Kondisi fisik krim

dibandingkan selama percobaan dengan sediaan sebelumnya. Metode dengan *cycling test* ini dilakukan sebanyak 6 siklus (Mardikasari *et al.*, 2020).

#### **F. Analisis Data**

Data dianalisis menggunakan Uji *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan program SPSS. Dilakukan pengujian data normalitas kemudian homogenitas sebagai syarat analisis data sebelum melakukan uji ANOVA. Uji normalitas data bertujuan untuk mengetahui apakah data mengikuti sebaran normal atau tidak. Uji data homogenitas digunakan untuk menguji apakah masing-masing kelompok mempunyai kesamaan rata-rata varian, dipenuhi jika hasil uji signifikan dengan taraf signifikansi ( $\alpha = 0,05$ ). Jika data tidak memenuhi syarat uji *One Way Anova* maka dilakukan uji non parametrik *Kruskal-wallis* (Aimana, 2021).