

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium yang dilakukan di Laboratorium kimia farmasi program studi farmasi, fakultas sains teknologi dan kesehatan, Universitas Sahid Surakarta pada bulan Februari-April 2021 untuk meneliti aktivitas antibakteri *Propionibacterium acne* secara *in-vitro* ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan konsentrasi 10%. 15% dan 20% dengan menggunakan metode dilusi.

#### **3.2 Populasi dan Sampel**

##### **a. Populasi**

Menurut (Notoatmodjo Soekidjo, 2012) mendeskripsikan populasi sebagai keseluruhan objek penelitian atau objek yang akan diteliti oleh peneliti. Objek tersebut dapat berupa manusia, hewan, tumbuh-tumbuhan, benda-benda mati lainnya, seperti peristiwa dan gejala yang terjadi didalam masyarakat atau didalam alam. Populasi pada penelitian ini adalah semua daun jeruk purut .

##### **b. Sampel**

Sampel didefinisikan oleh Notoatmodjo Soekidjo., (2012) sebagai objek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi. Sampel dalam

penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% yang telah ditambahkan kedalam formulasi *vanishing cream* dengan konsentrasi 10%,15%, dan 20%.

### 3.3 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian merupakan alat bantu yang dipilih dan digunakan oleh peneliti dalam kegiatannya mengumpulkan kegiatan tersebut menjadi sistematis dan dipermudah olehnya.

Instrument penelitian ini antara lain :

- a. **Alat** : Blender (philips), ayakan, toples kaca, *rotary evaporator* (bio base), alat-alat gelas (pyrex), aluminium foil (kiln pak), kertas saring (whatman), timbangan analitik (ohapus CP 24), cawan porselen (pudak), batang pengaduk (xuebei), wadah *cream*, kaca transparan (pyrex), kaca bulat (pyrex), jangka sorong (mutituyo), cawan petri (pyrex), *magnetic stirrer* (IKA HS7), alat ukur daya sebar, indicator pH universal, *autoclave* (model YXQ.SG41.46.280AS), inkubator (WINA tipe 801), ose steril, pinset, spirtus, mikropipet (dragon onemed), *laminary air flow* (WINA tipe 304), dan neraca analitik (ACIS).
- b. **Bahan** : Daun jeruk purut yang diperoleh dari desa Dompnyongan, *water for injection* (IKA Pharmindo), etanol 96% (merck), dragendrof (merck), serbuk Mg (merck), HCl pekat (merck), FeCl<sub>3</sub> 1% (merck), FeCl<sub>3</sub> 5% (merck), CH<sub>3</sub>COOH (merck),

petroleum eter (merck), asam stearate (merck), trieanolamin (merck), gliserin (merck), bakteri *Propionibacterium acne* yang diperoleh dari universitas setia budi Surakarta, Nutrient agar (NA) (Oxold), nutrient broth (NB) (Oxold), dan *muller hinton agar* (MHA) (Oxold).

### 3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian merupakan sifat atau nilai dari objek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2014) Pada penelitian ini menggunakan dua variabel yakni :

a. Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat mempengaruhi atau dapat menjadi penyebab perubahan atau timbulnya variabel terikat (Sugiyono, 2014). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) pada sediaan *vanishing cream*.

b. Variabel terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang muncul karena adanya pengaruh dari variabel bebas (Sugiyono, 2014) Variabel terikat dalam penelitian ini adalah analisa kualitatif ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC), uji fisik sediaan *vanishing cream*, serta uji aktivitas antibakteri *Propionibacterium acne* pada sediaan *vanishing cream*.

c. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan serta bersifat tidak dapat dipengaruhi oleh faktor luar (Sugiyono, 2014). Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah formulasi *vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dengan konsentrasi 10%, 15%, dan 20%.

### 3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional merupakan pembatasan ruang lingkup atau pengertian variabel-variabel yang diamati atau diteliti (Notoatmodjo Soekidjo, 2012)

Dalam penelitian ini menggunakan dua definisi operasional yakni :

- a. Ekstrak etanol daun jeruk putur merupakan daun jeruk purut yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%.
- b. Konsentrasi ekstrak etanol daun jeruk purut pada formulasi *vanishing cream* adalah tiga seri konsentrasi yaitu konsentrasi 10%, 15% dan 20%.
- c. *Vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut adalah sediaan topikal berbasis minyak dalam air dengan komposisi asam stearate, gliserin, trietanolamin dan aquadest ad 100.
- d. Metode uji aktivitas antibakteri *Propionibacterium acne* menggunakan metode cakram *disk*.
- e. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan pengamatan diameter pada zona bening disekitar kertas cakram yang telah berisi konsentrasi ekstrak etanol daun jeruk purut.

### 3.6 Rencana Jalannya Penelitian

Rencana jalannya penelitian terdiri dari beberapa tahapan yakni :

#### 3.6.1 Pengambilan sampel

Daun tanaman jeruk purut yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari daerah Klaten.

#### 3.6.2 Derterminasi sampel

Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta di Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Kec. Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah 57127.

#### 3.6.3 Pembuatan ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC)

Serbuk simplisia daun jeruk purut diayak dan ditimbang sebanyak 1600 gram dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 8 liter (dengan perbandingan 1 : 5) dan ditutup dengan aluminium foil selama 3 hari (setiap hari diaduk) kemudian disaring menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat 1 dan ampas 1. Ampasnya direndam ulang dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 750 ml selama 2 hari (diaduk setiap hari), kemudian kedua filtrate yang diperoleh digabung menjadi satu dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Yanus, 2017).

Menghitung rendemen ekstrak dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

#### 3.6.4 Analisa Kualitatif Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut :

a. Uji kandungan fitokimia alkaloid

Uji kandungan fitokimia alkaloid dilakukan dengan menggunakan 1 mL sampel diletakkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan reagen dragendrof sebanyak 5 tetes. Lalu diamati perubahannya pada sampel menunjukkan terjadinya perubahan warna jingga, maka sampel positif mengandung alkaloid (Mustikarini dan Ariyani., 2010).

b. Uji kandungan flavonoid

Uji kandungan flavonoid dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 1 mL diletakkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Didapatkan hasil perubahan warna menjadi merah pekat, yang berarti sampel positif (+) mengandung flavonoid. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Mustikarini dan Ariyani., 2010) .

c. Uji kandungan tannin

Uji kandungan tanin dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 1 mL diletakkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1% 3 tetes. Jika pada larutan terbentuk coklat kehijauan atau biru kehitaman maka sampel tersebut positif mengandung tannin (Marlinda *et al.*, 2012).

d. Uji kandungan fenolik

Uji kandungan fenolik dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 1 mL diletakkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  sebanyak 3 tetes, Jika pada larutan terbentuk warna kuning hingga sampai dengan merah, maka sampel tersebut positif mengandung Fenolik (Pursitasari *et al.*, 2014).

e. Uji kandungan steroid dan terpenoid

Uji kandungan steroid dan terpenoid dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 1 mL diletakkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan petroleum eter 2mL didiamkan selama 2 jam dan disaring filtratnya. Dari filtrate tersebut kemudian diuapkan hingga diperoleh residu, kemudian residu tersebut ditambahkan dengan 2 tetes larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan 1 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Jika pada larutan terjadi perubahan warna menjadi biru, maka sampel tersebut positif mengandung terpenoid dan steroid (Djamil dan Sarah., 2014).

f. Uji identifikasi minyak atsiri

Uji identifikasi minyak atsiri dilakukan dengan menimbang 1 gram serbuk kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang ditambahkan 10 ml pelarut petroleum eter dan pasang corong yang telah diberi lapisan kapas dan dibasahi air pada mulut tabung. Panaskan selama 30 menit diatas penangas air kemudian dinginkan kemudian saring menggunakan kertas saring. Filtrat yang terbentuk kemudian diuapkan pada cawan penguap hingga mengering dan

residu yang diperoleh dilarutkan dengan 5 ml pelarut alkohol kemudian saring dengan kertas saring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap hingga residu tercium bau aromatik yang menunjukkan adanya senyawa golongan minyak atsiri (Djamil, 2014).

### 3.6.5 Pembuatan sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC)

Sediaan *vanishing cream* ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) yang akan dibuat terdiri dari bahan aktif dan bahan tambahan.

**Tabel 3.1 komposisi formulasi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC).**

Komposisi bahan	Konsentrasi			Manfaat
Ekstrak daun jeruk purut	10%	15%	20%	Zat aktif
Asam stearate	15 %	15 %	15%	emulgator dan <i>solubilizing agent</i>
Gliserin	5 %	5 %	5 %	Humektan dan emolien
Trietanolamin	2 %	2 %	2 %	<i>alkalizing agent</i> dan <i>emulsifying agent</i>
Aquadest	Ad 100ml	Ad 100ml	Ad 100ml	Pelarut

**Sumber : Depkes, 1978 dan Maimunah et al, 2020**

Pembuatan sediaan *vanishing cream* dilakukan dengan cara fase minyak asam stearate dipanaskan kedalam *waterbath* dengan suhu 70°C hingga melebur, Fase air yaitu Trietanolamin, gliserin, dan aquadest. Dipanaskan diatas *waterbath* dengan suhu 70°C, setelah semua melebur, campurkan kedua campuran tersebut sedikit demi sedikit dan diaduk hingga homogen dan diperoleh *cream* seputih susu, menambahkan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) yang telah dilarutkan dengan aquadest kedalam basis *cream* dan diaduk hingga homogen.

### 3.6.6 Uji fisik sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut

(*Citrus hystrix* DC)

a. Uji Homogenitas

Menimbangkrim 0,1 g kemudian diletakkan pada kaca objek dan dioleskan secara merata dan tipis pada kaca. Sediaan harus homogeny dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979).

b. Uji Organoleptis

Pengamatan warna, bau, dan penampilan *cream* pada saat selesai diformulasikan (Kuncari *et al*, 2014).

c. Uji pH kulit (4,5-8,0)

Mengambil *cream* secukupnya dan dilarutkan dengan aquadest secukupnya, kemudian diukur dengan indicator pH universal (Tranggono dan Latifa, 2007).

d. Uji Daya Sebar

Menimbang 0,5 gram *cream* kemudian diletakkan ditengah cawan petri yang berada dalam posisi terbalik. Meletakkan cawan petri lain diata *scream* selama 1 menit dan diukur diameternya, kemudian menambahkan beban selama 1 menit diatasnya dan diukur lagi diameternya (Ugandar & Deivi, 2013).

e. Uji Daya Lekats

Menimbang 0,5 gram *vanishing cream* kemudian meletakkannya pada plat kaca. Membalik kaca objek sehingga kedua sisi plat

menyatu dan diberi beban awal sebesar 250 gram selama 5 menit kemudia lepaskan dengan memberi beban sebesar 80 gram, catat waktu terlepasnya kaca objek tersebut (Ariem et al., 2020).

f. Uji Daya Tercuci

Mengoleskan 1 g krim dioleskan ketelapak tangan kemudian dicuci dengan air mengalir sambil membilas menggunakan tangan. Dan hitung waktu krim tercuci.

g. Uji *freeze-thaw*

Uji *freeze-thaw* dapat dilakukan memasukkan *cream* kedalam wadah yang cocok kemudian sediaan *vanishing cream* setelah *cream* dibuat dan dilakukan menggunakan kondisi paksaan yaitu dengan melakukan penyimpanan pada suhu  $-10^{\circ}\text{C}$  dan suhu ruang masing masing selama 24 jam dilakukan sebanyak 3 siklus kemudian diamati ada tidaknya pemisahan fase, pengamatan organoleptis, uji pH, uji Homogenitas, uji daya sebar, daya lekat dan uji daya tercuci (Avachat dan Patel, 2015; Yuliani *et al.*, 2016).

### **3.6.7 Uji antibakteri *Propionibacterium acne* sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC)**

a. Pembuatan media agar miring (NA)

Sebanyak 2,8 gram nutrient agar dilarutkan dengan air suling steril dan ditambahkan 100 ml kemudian dipanaskan hingga semua larut, pada keadaan panas larutan tersebut kemudian dimasukan

kedalam erlenmayer, lalu disterilkan di autoklaf selama 15 menit pada suhu 121<sup>0</sup>C (Oxoid, 2013).

b. Pembuatan media cair dan suspensi bakteri

Media cair dibuat menggunakan *nutrient broth* (NB) dengan menimbang NB sebanyak 3,25 gram dan dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan aquadest steril sebanyak 150 ml lalu dipanaskan diatas kompor elektrik hingga mendidih dan homogen. media cair yang telah homogeny kemudian di sterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Media didiamkan selama 24 jam.

Suspense bakteri pada media NB dilakukan dengan mengambil satu koloni bakteri pada media agar miring yang telah ditumbuhkan sebelumnya dengan menggunakan jarum ose steril, kemudian dimasukkan pada media NB. Bakteri pada media cair diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne* ditandai dengan adanya kekeruhan pada media (Mahmudah dan Atun, 2017).

c. Pembuatan media *muller hiton agar* (MHA)

Memanaskan media MHA sebanyak 3,8 gram dengan aquadest 100ml. Kemudian disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Media dituang kedalam cawan petri sebanyak 15 ml dan pengerjaan dilakuakn didalam *laminary air flow* (LAF) (Mahmudah dan Atun, 2017).

#### d. Pengujian antibakteri

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Penelitian ini dilakukan menggunakan 3 cawan petri kosong dan 15 kertas cakram. Kertas cakram direndam selama 5 menit dalam masing-masing konsentrasi *vanishing cream* 10%, 15%, dan 20% serta pada kontrol negatif dan kontrol positif.

Masing-masing cawan petri yang berisi media MHA yang sudah diinokulasikan 0,1ml bakteri *Propionibacterium acne* tersebut kemudian di letakkan 5 kertas cakram dari 5 perlakuan dan dilakukan 3 kali replikasi. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan mengukur zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram, setelah masa inkubasi setiap 1 x 24 jam. Antibiotik *clindamycin* dalam bentuk *cream* dipilih sebagai kontrol positif dan basis *cream* sebagai kontrol negatif digunakan sebagai pembanding yang dilihat zona hambatnya pada mikroba uji.

**Tabel 3.2 Parameter Zona Hambat**

Intensitas	Diameter Zona Hambat
Sangat Kuat	> 20 mm
Kuat	10-20 mm
Sedang	5-10 mm
Lemah	< 5 mm

Sumber : Salman *et al* (2011)

### 3.7 Analisa Data

Analisis data pada uji aktivitas antibakteri *Propionibacterium acne* secara in-vitro sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut yaitu diperoleh data stabilitas fisik dan aktivitas antibakteri. Data stabilitas fisik meliputi organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat dan daya

tercuci, kemudian dianalisis menggunakan program SPSS 21 uji *Shapiro-wilk*, dengan membandingkan antara konsentrasi ekstrak 10%, 15% dan 20%, kontrol positif dan kontrol negative, bila data dinyatakan terdistribusi normal maka dapat dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA, akan tetapi jika data diketahui tidak terdistribusi normal maka perlu dilakukan uji *statistic nonparametric* menggunakan uji *kruskal-wallis* yang kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji *manwithney* (Effendi, 2017).