

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental yang dilakukan dengan melakukan uji aktivitas antibakteri gel *handsanitizer* Ekstrak Etanol 70% Daun Kenikir (*Cosmos caudatus K.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2021 – Mei 2021 di Laboratorium Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasinya adalah ekstrak etanol 70% daun kenikir. Sampel yang digunakan adalah gel *handsanitizer* ekstrak etanol 70% daun kenikir dengan konsentrasi 2%, 5% dan 10%.

3.3 Instrumen Penelitian

a. Alat

Alat - alat yang digunakan adalah autoklaf, inkubator (WINA), lemari pendingin (LG), *laminar Air Flow* (WINA) , *hotplate* (AE), *blender* (Phillip), timbangan analitik (ACSS), oven (*Memmert*), jangka sorong, cawan petri, alat - alat gelas (*pyrex*), pinset, jarum *ose*, spidol marker, masker dan sarung tangan.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70% (one med), natrium hipoklorit (T&T Chemical), daun kenikir (diambil dari

desa Mangu, kecamatan Ngemplak, kabupaten Boyolali), cakram kertas (*OXOID*), kapas (Medisoft ball), biakan murni *Staphylococcus aureus* (dari laboratorium STIKES Nasional Surakarta), gentamisin *disc* (*OXOID*), kuersetin (*aldach*), aluminium foil (Klin Pak), *aquadest* (Ikapharmindo), nutrient agar (Merck), carbopol 940 (Sanare Lab), trietanolamin (Merck), gliserin (Jaya Chemical), propilenglikol (Jaya Chemical), metil paraben (Jaya Chemical), *natrium broth* (Merck), serbuk magnesium (Merck), HCl (Merck), NaOH (polylab), dan FeCl₃ (T&T Chemical).

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari orang, obyek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2007)

Dalam penelitian ini ada tiga jenis variabel yaitu variabel bebas variabel yang dipandang sebagai penyebab munculnya variabel terikat sebagai akibatnya. Variabel terikat adalah variabel (akibat) yang dipradugakan, yang bervariasi mengikuti perubahan dari variabel bebas. Variabel terkendali (kontrol) adalah variabel yang ikut berpengaruh yang dibuat sama pada setiap media percobaan dan terkendali (Kerlinger, 1992).

a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol 70% daun kenikir sebesar 2%, 5% dan 10% dalam gel *handsanitizer*.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri gel *handsanitizer* ekstrak etanol 70% daun kenikir (*Cosmos caudatus* K) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah formulasi gel *handsanitizer* ekstrak etanol 70% daun kenikir (*Cosmos caudatus* K).

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yaitu definisi yang membatasi ruang lingkup atau Variabel - variabel yang diteliti. Definisi operasional pada penelitian ini adalah :

- a. Uji kualitatif dilakukan dengan menguji Ekstrak Etanol 70% Daun Kenikir dalam reaksi *Shinoda Test* (Mg+HCl), menghasilkan senyawa flavonoid.
- b. Konsentrasi Ekstrak Etanol 70% Daun Kenikir adalah konsentrasi ekstrak etanol 70% daun kenikir yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2%, 5%, dan 10%.
- c. Metode uji aktivitas antibakterinya menggunakan metode Uji difusi cakram dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak
- d. Gel *handsanitizer* Ekstrak Etanol 70% Daun Kenikir adalah *handsanitizer* yang diformulasikan dari ekstrak daun kenikir, carbopol 940, trietanolamin, gliserin, propilenglikol, metil paraben dan *aquadest*.

- e. Uji stabilitas gel *handsanitizer* dilakukan uji stabilitas fisik yang meliputi organoleptis, homogenitas, daya sebar, daya lekat, viskositas dan pH.

3.6 Jalannya Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah.

3.6.2 Penyiapan Simplisia

Penyiapan simplisia meliputi (Prasetyo & Entang, 2013):

- a. Pengumpulan bahan baku

Pengumpulan bahan baku yang digunakan adalah bagian Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* K).

- b. Sortasi Basah

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan cemaran (kotoran dan benda asing lain) dari bahan simplisia. Pembersihan simplisia dari tanah dapat mengurangi jumlah kontaminasi mikrobiologi.

- c. Pencucian

Pencucian dilakukan dengan air mengalir dan menggunakan air bersih.

- d. Pengeringan

Pengeringan bertujuan agar simplisia tidak cepat rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama. Dengan berkurangnya kadar air, maka reaksi enzimatik dapat dicegah sehingga penurunan mutu atau kerusakan simplisia dapat dihindari. Pengeringan menggunakan oven dapat dilakukan pada suhu 30°C - 90°C (terbaik 60°C). Jika bahan aktif tidak tahan panas atau

mudah menguap maka pengeringan dilakukan dengan dikering anginkan terhindar dari sinar matahari langsung.

e. Sortasi kering

Tujuan sortasi adalah untuk memisahkan benda asing, seperti bagian tumbuhan yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang masih tertinggal pada simplisia kering yang telah di oven.

f. Pengepakan dan penyimpanan

Simplisia disimpan pada suhu yang sesuai dengan sifat dan ketahanan simplisia, seta dihindarkan dari faktor - faktor yang dapat mempengaruhi mutu simplisia.

3.6.3 Ekstraksi Sampel

Sebanyak 1 kg simplisia daun kenikir kering diblender dan diayak dengan pengayak *mess* 40. Serbuk diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% 10 kalinya kedalam wadah maserasi dan diekstraksi dengan etanol 70% hingga sampel terendam sempurna, lalu disimpan selama 5x24 jam dalam wadah tertutup dan terlindungi dari cahaya matahari langsung, sampel diaduk pada tiap pagi dan sore. Sampel disaring menggunakan kain flanel sehingga diperoleh filtrat. Filtrat yang diperoleh, dikumpulkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental (Pratiwi *et al.*, 2019).

3.6.4 Uji Kualitatif

Uji senyawa flavonoid dilakukan dengan menguji ekstrak etanol 70% daun kenikir dalam reaksi *Shinoda Test* $Mg+HCl$. Sejumlah Ekstrak etanol 70% daun

kenikir dilarutkan dengan 1 mL etanol 70% ditambahkan dengan serbuk magnesium dan HCl pekat menghasilkan warna merah kekuningan maka positif mengandung flavonoid (Pratiwi et al., 2019).

3.6.5 Formulasi gel *hand sanitizer*

Formula ini dirancang dalam bentuk sediaan *hand gel* dengan menggunakan bahan aktif ekstrak etanol 70% daun kenikir. Sediaan *hand gel* ini dibuat menjadi tiga formula, perbedaan dari ketiga formula ini yaitu terletak pada konsentrasi ekstrak daun kenikir, dapat dilihat seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 3. 1 Formula Gel Handsanitizer

Bahan	Kegunaan	Konsentrasi (%)			
		F1	F2	F3	F4
Ekstrak Daun Kenikir	Zat aktif / antibakteri	-	2	5	10
Carbopol 940	Bahan pembawa gel	0,5	0,5	0,5	0,5
Trietanolamin	Agen pengemulsi	1	1	1	1
Gliserin	Agen pelembab	15	15	15	15
Propilenglikol	Agen pelembab	10	10	10	10
Metil Paraben	Pengawet	0,1	0,1	0,1	0,1
Aromatik	Zat tambahan	q.s	q.s	q.s	q.s
<i>Aquadest</i>	Zat tambahan	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Sumber : (Hajrah et al., 2017)

3.6.6 Pembuatan sediaan gel *handsanitizer* daun kenikir

Timbang semua bahan yang diperlukan sesuai formula dalam tabel 3.1. Masukkan carbopol 940 ke dalam lumpang dan ditambah *aquadest* kemudian digerus terus menerus hingga jernih dan homogen. Tambahkan ekstrak daun kenikir untuk F1, F2 dan F3. Tambahkan trietanolamin dan gliserin aduk kuat sampai terbentuk massa gel. Tambahkan propilenglikol, metil paraben, aromatik dan *aquadest* ad 100 gram sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai terbentuk massa gel (Hajrah et al., 2017).

3.6.7 Evaluasi Sediaan *Handsanitizer* Daun Kenikir

a. Uji Organoleptis

Dilakukan pengamatan secara visual terhadap sediaan gel yang didapatkan meliputi bau, warna dan bentuk dari sediaan gel (Kusumawati, 2012).

b. Uji Homogenitas

Evaluasi homogenitas dilakukan dengan mengoleskan sedikit sediaan gel diantara dua kaca obyek dan diamati adanya partikel - partikel kasar dibawah cahaya. Evaluasi ini penting dilakukan agar dapat mengetahui bahwa zat aktif terdistribusi merata dalam sediaan dan tidak ada partikel yang menggumpal. Secara fisik semua sediaan memiliki homogenitas yang baik (Hasanah et al., 2020).

Sediaan dilakukan dengan cara sampel gel dioleskan pada *obyek* glass atau bahan transparan lain yang cocok, sediaan tersebut harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar.

d. Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan dengan cara 0,5 gram sediaan di letakkan di atas kaca bagian atasnya di beri kaca yang sama, dan ditingkatkan bebannya, dan di beri rentang waktu 1 menit. Penyebaran diukur pada setiap penambahan beban, saat sediaan berhenti menyebar (dengan waktu tertentu secara teratur) (Sayuti et al., 2015)

D. Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan cara meletakkan gel (secukupnya) diatas *obyek glass* yang telah ditentukan luasnya. Letakkan *obyek glass* yang lain diatas

gel tersebut tekanlah dengan beban 1 kg selama 5 menit. Pasanglah *obyek glass* pada alat. Lepaskan beban seberat 100 g dan catat waktunya hingga kedua *obyek glass* tersebut terlepas (Wasiaturrahmah & Jannah, 2018).

e. Uji viskositas

Uji viskositas dilaksanakan di laboratorium Stikes Nasional. Alat yang digunakan untuk uji viskositas adalah *viscometer brookfield*. Mangkuk diisi setengah sampel gel yang akan diuji. Rotor ditempatkan ditengah tengah mangkuk yang berisi gel, kemudian alat dihidupkan agar rotor mulai berputar, jarum penunjuk viskositas secara otomatis akan bergerak ke kanan. Setelah stabil, kemudian dibaca pada skala yang ada pada viskometer tersebut (Kusumawati, 2012).

f. Uji pH

Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan alat pH meter digital. Alat terlebih dahulu dikalibrasi dengan menggunakan larutan dapar standar (pH 7,01) dan larutan dapar ph asam (pH 4,01) hingga alat menunjukkan angka pH tersebut. Kemudian di elektroda di cuci dengan air suling, lalu dikeringkan dengan tissue. Sampel dibuat dalam konsentrasi 8% yaitu 1 gram sediaan dan dilarutkan dalam air suling hingga 100 mL. kemudian elektroda di celupkan dalam larutan tersebut. Dibiarkan alat menunjukkan angka pH sampai konstan. Angka yang ditunjukkan pH meter digital merupakan pH sediaan.

3.6.8 Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum melakukan pengujian, alat, dan bahan disterilisasi terlebih dahulu.

Alat - alat yang digunakan seperti alat - alat gelas disterilkan didalam oven pada suhu 160°C selama 2 jam, bahan - bahan seperti *nutrient* agar (NA) disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, jarum *ose* dan pinset dipijarkan dengan lampu bunsen (Lestiani, 2013).

b. Pembuatan Medium

Pembuatan media tumbuh bakteri (NA) dilakukan dengan cara 1 g NA dilarutkan dalam 5 mL *aquadest*, dicampurkan lalu dipanaskan diatas hotplate sambil diaduk sampai mendidih, dituang secukupnya pada cawan petri, dibiarkan hingga larutan membentuk padatan (Lestiani, 2013)

c. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara 1 g Natrium Broth (NB) dilarutkan dalam 9 mL *aquadest*, dituangkan ke dalam bejana erlenmeyer. Selanjutnya diambil bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan jarum *ose* lalu dicelupkan dan diaduk dalam larutan NB. Selanjutnya dinkubasi dalam inkubator selama 24 jam (Nurchayanti et al., 2011)

d. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode *Kirby - Bauer* yang menggunakan cakram kertas. Cakram kertas steril dengan diameter 5 mm dicelupkan dalam variasi konsentrasi ekstrak yang berbeda selama 60 menit setelah itu dikeringkan dengan *hairdryer*. Bakteri diambil sebanyak 0,1 mL kemudian dituang dalam media dan diratakan dengan batang *drigalski*.

Cakram kertas diletakkan pada media berisi bakteri yang sebelumnya sudah dibagi menjadi 5 kuadran. Kuadran I berisi kontrol positif berupa gentamisin *disc*,

kuadran II berisi kontrol negatif berupa cakram kertas yang dicelupkan pada basis gel tanpa zat aktif, kuadran III berupa cakram kertas yang dicelupkan pada gel konsentrasi 2%, kuadran IV berupa cakram kertas yang dicelupkan pada gel konsentrasi 5% dan kuadran V berupa cakram kertas yang dicelupkan pada gel dengan konsentrasi 10%. Pengujian antibakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar (Davis & Stout, 1971).

Tabel 3. 2 Kategori Zona Hambat

No	Kategori	Zona Hambat
1.	Lemah	< 5 mm
2.	Sedang	5 - 10 mm
3.	Kuat	10 - 20 mm
4.	Sangat Kuat	>20 mm

Sumber : (Davis & Stout, 1971)

3.7 Analisis Data

Penelitian uji aktivitas antibakteri gel *handsanitizer* ekstrak etanol 70% daun kenikir ini terdiri dari 5 kelompok yakni 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol (positif dan negatif) dengan 3 kali pengulangan. Hasil perlakuan penelitian dianalisis dengan uji statistik ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan derajat kepercayaan 95% ($p < 0,05$). Sebelum dianalisis dengan uji ANOVA dilakukan uji normalitas dengan uji *Kolmogorov – Smirnov* dan uji homogenitas dengan uji *Levene*. Uji normalitas digunakan untuk mengetahui data yang telah diperoleh telah terdistribusi secara normal atau tidak, sedangkan uji homogenitas digunakan untuk memperlihatkan bahwa dua atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi sama. Analisis dilakukan dengan program SPSS versi 21.