

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan (Januari – April 2025) di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bejana maserasi, oven, timbangan analitik (Ohaus), *blender* (Philips), ayakan mesh no.40, *rotary evaporator*, cawan porselen, *waterbath*, rak tabung, mortir dan *stamper*, *viscometer Brookfield* (Welhome HQ-60W-12V), pH meter, lampu bunsen, autoklaf (Allamerian YX-280B), cawan petri, jarum ose, kertas cakram, batang L, kompor listrik, termometer, inkubator (Memmert IN-55), alat-alat gelas (Pyrex) meliputi erlenmeyer, corong, gelas beaker, batang pengaduk, labu takar, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, dan tabung reaksi serta penggaris.

##### **3.2.2 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pepaya callina, daun sirih hijau, aquadest, etanol 96 %, aqua DM, FeCl<sub>3</sub> 1%, serbuk magnesium (Mg), HCl pekat, HCl 2N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, BaCl<sub>2</sub>, NaCl 0,9 %, reagen Mayer, carbopol, trietanolamin, gliserin, metilparaben, propilparaben, SLS, pengaroma *tutty fruity*, *Nutrient Agar* (NA), pepton, ekstrak daging, Stik pH, *aluminium foil*, bakteri *Propionibacterium acnes*, kertas cakram dan kertas saring.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan jenis penelitian kualitatif dengan metode pendekatan eksperimental laboratorium untuk membuat sediaan *face wash* kombinasi ekstrak daun pepaya callina (*Carica papaya* L.) dan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) serta mengetahui aktivitas daya hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acne* dengan variabel seperti di bawah ini:

1. Variabel bebas

Variabel bebas, merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menyebabkan terjadinya perubahan. Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah konsentrasi kombinasi ekstrak daun pepaya callina (*Carica papaya* L.) dan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dari sediaan *face wash*.

2. Variabel terikat

Variabel terikat merupakan faktor-faktor yang diamati dan diukur oleh peneliti dalam sebuah penelitian. Variabel terikat yang digunakan pada penelitian ini adalah kemampuan daya hambat formula sediaan *face wash* terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dan uji sifat fisik sediaan *face wash*.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol merupakan variabel yang diupayakan untuk dinetralisasi oleh peneliti. Variabel yang digunakan adalah tempat pengambilan sampel, metode ekstraksi, pelarut, waktu, suhu inkubasi, kontrol positif, dan penimbangan.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

Prosedur penelitian adalah tahapan kegiatan yang dilaksanakan oleh peneliti secara teratur dan sistematis untuk mencapai tujuan dari penelitian dari pengambilan sampel hingga analisis data. Tahapan prosedur penelitian ini meliputi :

#### **3.4.1 Pengambilan Sampel**

Sampel daun pepaya callina dan daun sirih hijau diperoleh dari daerah Desa Batuagung, Kecamatan Balapulang, Kabupaten Tegal. Dengan cara memanen langsung pada pohon tanaman.

#### **3.4.2 Determinasi Tumbuhan**

Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan dalam penelitian ini. Determinasi dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

#### **3.4.3 Preparasi dan Pengolahan Simplisia**

Berat basah daun pepaya yang digunakan sebesar 5,5 kg dan daun sirih hijau sebesar 4,2 kg, kemudian dilakukan sortasi basah terlebih dahulu untuk memisahkan antara pengotor seperti tanah dan sisa kotoran pada daun dengan cara mencuci daun menggunakan air mengalir hingga bersih. Kemudian daun pepaya callina dan daun sirih hijau ditiriskan dan dirajang untuk memudahkan proses pengeringan dengan menggunakan oven. Lalu dilakukan sortasi kering dengan memisahkan bagian tanaman yang tidak diperlukan serta pengotor lainnya. Setelah diperoleh simplisia kering, daun pepaya callina dan

daun sirih hijau diserbuk menggunakan blender lalu diayak menggunakan ayakan nomor 40 *mesh*.

#### 3.4.4 Ekstraksi Sampel

Pembuatan ekstrak daun pepaya dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Diambil sebanyak 500 g simplisia dimaserasi dengan menambahkan etanol 96% sebanyak 3000 mL selama 24 jam sambil diaduk hingga seluruh simplisia terendam etanol. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan diuapkan kembali menggunakan *waterbath* untuk menguapkan pelarut yang tersisa sampai seluruh pelarut etanol menguap agar diperoleh ekstrak kental (Wali et al., 2024).

Ekstraksi daun sirih hijau dilakukan menggunakan metode dingin yaitu maserasi dengan rasio perbandingan 1:4. Simplisia daun sirih sebanyak 500 g direndam dengan 2 L pelarut etanol 96 %. Perendaman dilakukan selama 3 hari dan setiap 1 hari dilakukan remaserasi dengan cara residu direndam ulang dengan pelarut dan volume yang sama. Selanjutnya, disaring dan diperoleh hasil filtrat (maserat) dan residu. Hasil filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, lalu filtrat diuapkan kembali menggunakan *waterbath* sampai seluruh pelarut etanol menguap sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian ditimbang dan selanjutnya dihitung rendemen ekstrak yang diperoleh (Julianti et al., 2023).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Jumlah berat ekstrak (gram)}}{\text{Jumlah berat kering (gram)}} \times 100\%$$

### 3.4.5 Uji Standardisasi Ekstrak

#### 1. Uji Organoleptis Ekstrak

Pengujian parameter spesifik dilakukan secara organoleptis dengan mengamati warna, bentuk, bau, dan rasa dari ekstrak etanol tanaman yang digunakan (Depkes, 2000).

#### 2. Penetapan Susut Pengeringan

Simplisia dan ekstrak masing-masing ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam krus porselin bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Cawan krusibel dimasukkan ke dalam oven dalam keadaan tutup cawan krusibel terbuka, dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap, didinginkan dalam desikator. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali kemudian dihitung persentasenya (Kemenkes, 2017).

$$\% = \frac{\text{Berat awal}-\text{Berat akhir}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

#### 3. Penetapan Kadar Air

Uji kadar air dilakukan menggunakan *moisture analyzer* yang diset pada suhu 105°C dan secara otomatis akan langsung memeriksa ketika alat ditutup. Ambil 2 gram ekstrak ratakan di atas cawan aluminium. Alat kemudian ditutup dan diamkan hingga memberikan tanda. Angka yang tertera pada alat dapat dicatat dan

diketahui kadar air dari simplisia. Jika kadar air yang diperoleh 10% maka dinyatakan memenuhi syarat (Maharisti et al., 2022).

#### 4. Penetapan Kadar Abu Total

Simplisia dan ekstrak masing-masing ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam cawan krusibel yang telah dipijar dan ditara, dipijarkan perlahan-lahan hingga suhu yang menyebabkan senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sampai tinggal unsur mineral dan anorganik pada suhu, dinginkan dan timbang. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Kemenkes, 2017).

$$\text{Kadar abu total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan:

W<sub>0</sub> = Bobot cawan kosong (gram)

W<sub>1</sub> = Bobot cawan awal (gram)

W<sub>2</sub> = Bobot cawan + ekstrak setelah di abukan (gram)

#### 3.4.6 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak daun pepaya callina dan ekstrak daun sirih hijau untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung didalamnya secara kualitatif.

##### 1. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g sampel ekstrak dilarutkan dengan 5 mL aquades dan dipanaskan selama ± 5 menit di dalam tabung reaksi lalu filtrat disaring. Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat kemudian dikocok. Uji positif flavonoid ditunjukkan

dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Rukmini, 2020).

## **2. Uji Saponin**

Ekstrak 0,5 g ditambahkan 10 mL aquades hangat, kemudian dikocok selama 10 detik. Saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Rukmini, 2020).

## **3. Uji Tanin**

Ekstrak 0,5 g dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL aquades yang mendidih, kemudian ditambahkan 2-3 tetes FeCl<sub>3</sub> 1 %, adanya tanin ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (Rukmini, 2020).

## **4. Uji Alkaloid**

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 1 mL HCl 2N dan diencerkan dengan 9 mL aquades, selanjutnya panaskan di atas penangas air selama 2 menit dan dididihkan. Larutan dibagi menjadi 3 tabung masing-masing sebanyak 2,5 mL. Penambahan reagen Mayer akan menghasilkan endapan berwarna putih sebagai indikator positif senyawa alkaloid, penambahan reagen Dragendorff positif ditandai dengan hasil larutan berwarna merah jingga, dan penambahan reagen Wagner ditandai dengan terbentuk larutan berwarna coklat (Florensia dan Wijaya, 2023).

### 3.4.7 Formulasi Sediaan *Face Wash*

Sediaan gel *face wash* dibuat dalam 3 formulasi yang dibedakan pada konsentrasi kombinasi zat aktif, dengan konsentrasi kombinasi zat aktif total 20%. Formula sediaan gel *face wash* dapat dilihat pada tabel berikut.

| <b>Tabel 3. 1</b> Formulasi Sediaan |                 |       |       |       |                      |                                |
|-------------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|----------------------|--------------------------------|
| Bahan                               | Konsentrasi (%) |       |       |       | Fungsi               | Standar<br>(Rowe et al., 2009) |
|                                     | F 0             | F 1   | F 2   | F 3   |                      |                                |
| Ekstrak daun pepaya                 | -               | 5     | 10    | 15    | Antibakteri          | -                              |
| Ekstrak daun sirih                  | -               | 15    | 10    | 5     | Antibakteri          | -                              |
| Gliserin                            | 15              | 15    | 15    | 15    | Humektan             | $\leq 30$ %                    |
| Carbopol                            | 1               | 1     | 1     | 1     | <i>Gelling agent</i> | 0,5 – 2 %                      |
| Metilparaben                        | 0,18            | 0,18  | 0,18  | 0,18  | Pengawet             | 0,02 - 0,3 %                   |
| Propilparaben                       | 0,02            | 0,02  | 0,02  | 0,02  | Pengawet             | 0,01 - 0,6 %                   |
| SLS                                 | 1               | 1     | 1     | 1     | Pembentuk busa       | 0,5 – 2,5 %                    |
| Trietanolamin                       | 2               | 2     | 2     | 2     | <i>Alkalizing</i>    | 2 – 4 %                        |
| Pengaroma <i>tutti fruity</i>       | qs              | qs    | qs    | qs    | Pengaroma            | -                              |
| Aquades                             | 50 mL           | 50 mL | 50 mL | 50 mL | Pelarut              | -                              |

### 3.4.8 Pembuatan Sediaan *Face Wash*

Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Langkah pertama dilakukan dengan mencampurkan masing-masing *gelling agent* dengan aquadest panas pada mortir yang sudah dipanaskan, aduk homogen hingga mengembang, larutkan metilparaben dan propilparaben dengan aquadest pada beaker *glass* tambahkan Na-lauril sulfat aduk ad homogen, kemudian ditambahkan gliserin aduk homogen tambah ekstrak daun sirih dan ekstrak daun pepaya aduk ad

homogen. Lalu tuangkan sedikit demi sedikit ke mortar berisi basis aduk merata, terakhir masukkan trietanolamin aduk ad homogen (Gunarti, 2018).

### **3.4.9 Evaluasi Sediaan**

#### **1. Uji Organoleptis**

Pengamatan terhadap sifat fisik sediaan dan menyimpulkan perubahan fisik yang terjadi seperti bentuk sediaan, bau dan warna sediaan (Anonim, 1979).

#### **2. Uji pH**

Pengukuran pH dilakukan dengan indikator kertas pH universal. Kertas pH universal dicelupkan ke dalam sampel sediaan kemudian mengamati perubahan warna yang terjadi pada kertas indikator tersebut dan menentukan nilai pH. Nilai pH *face wash* yang baik adalah 4 - 5,7 atau sesuai dengan nilai pH kulit wajah manusia (Anonim, 1979).

#### **3. Uji Viskositas**

Viskositas sediaan ditetapkan dengan Viskosimeter *Brookfield* pada kecepatan 60 RPM dan menggunakan *Spindle* nomor 04. Nilai viskositas gel yang baik 500 – 20.000 cps (Hidayat et al., 2024).

#### **4. Uji Tingkat Busa**

Sampel sebanyak 1 g dilarutkan dalam air sebanyak 10 mL pada gelas ukur. Gelas ukur digoyangkan secara manual sebanyak

10 kali. Selanjutnya dapat diukur tinggi busa dan stabilitas busa diukur berdasarkan waktu yang dibutuhkan sampai busa mulai menghilang. Persyaratan tinggi busa menurut SNI yaitu 1,3-22 cm (Hidayat et al., 2024).

## 5. Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara sejumlah tertentu sediaan dioleskan pada dua keping kaca atau bahan transparan lain yang cocok. Sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Depkes RI, 2000).

### 3.4.10 Uji Aktivitas Antibakteri

#### 1. Sterilisasi Alat

Seluruh alat yang digunakan dalam penelitian ini dicuci bersih, kemudian disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm (Seko et al., 2021).

#### 2. Pembuatan Media Agar Miring

*Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 0,56 g dan dilarutkan ke dalam 20 mL aquades (28g/1000mL) menggunakan erlenmeyer. Selanjutnya dihomogenkan dengan *hot plate* hingga mendidih. Sebanyak 5 mL dituangkan pada 2 tabung reaksi steril dan kemudian ditutup dengan aluminium foil. Media tersebut disterilkan dalam *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit, dan dibiarkan pada suhu ruangan selama  $\pm 30$  menit hingga media

memadat pada kemiringan  $\pm 30^\circ$ . Media agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Gerung et al., 2021).

### 3. Pembiakan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan menggunakan metode *streak plate* (goresan). Biakan murni bakteri *Propionibacterium acnes* diambil satu ose kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada media *Nutrient Agar* (NA) secara aseptik. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam (Putu et al., 2024).

### 4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yaitu dengan cara biakan *Propionibacterium acnes* diambil dengan kawat ose steril, kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* (Gerung et al., 2021).

### 5. Pembuatan Media Uji Bakteri

Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA) dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 2,8 g. Kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer lalu dilarutkan dengan 100 mL aquades (28g/1000mL). Setelah itu media NA dihomogenkan di dalam labu erlenmeyer dan dipanaskan menggunakan *hot plate* selama  $\pm 10$  menit hingga NA larut. Media yang telah homogen disterilisasi menggunakan *autoklaf* selama 15 menit pada suhu  $121^\circ\text{C}$ . Setelah

itu media NA ditunggu hingga suhu  $\pm 40-45^{\circ}\text{C}$ , media NA yang telah dituang ke dalam cawan petri dibiarkan hingga memadat (Gerung et al., 2021).

## 6. Uji Daya Hambat Bakteri

Pengujian antibakteri dilakukan menggunakan media *Nutrient Agar* (NA) sebagai media untuk pertumbuhan bakteri dan sebagai lapisan dasar untuk uji antibakteri dengan metode difusi kertas cakram. Suspensi bakteri uji diinokulasikan secara merata diatas permukaan media padat *Nutrient Agar* (NA) yang telah diletakan pada cawan petri. Setelah mengering, kertas cakram diresapi dengan sediaan uji dan kontrol (positif dan negatif). Selanjutnya, kertas cakram diletakan diatas permukaan media padat *Nutrient Agar* (NA) yang telah diinokulasi dengan bakteri uji secara aseptik, kemudian diinkubasikan dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam sampai terbentuk zona bening disekeliling kertas cakram. Setelah 24 jam dari masa inkubasi, zona hambat yang terbentuk disekeliling kertas cakram diamati dan diukur yang menunjukkan kemampuan sediaan uji dan kontrol dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji (Julianti et al., 2023).

$$\text{Diameter zona hambat} = \frac{(D_v - D_c) + (D_h - D_c)}{2}$$

Keterangan :

$D_v$  = Diameter vertikal

$D_h$  = Diameter horizontal

$D_c$  = Diameter cakram

### 3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil uji aktivitas antibakteri dianalisis menggunakan program pengolahan data statistik SPSS 25. Uji distribusi normalitas digunakan *Shaphiro-Wilk* dan dilanjutkan dengan uji analisis statistik *One-Way ANOVA* untuk membandingkan ada tidaknya perbedaan bermakna pada masing-masing perlakuan.