

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama bulan Januari sampai Juni 2024 di Laboratorium Biologi Farmasi dan Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya: oven (Mammert), *Laminal Air Flow* (LAF), batang pengaduk (pyrex), penangas air (dss), timbangan (acis), timbangan analitik (HWH DJ203A), cawan petri, corong, pipet tetes, mikropipet, bunsen, kawat ose, pinset (onemed), jangka sorong, *beaker glass* (pyrex), inkubator (Mammert IN 55), kompor listrik, autoklaf (Alamerican), botol semprot, blender (miyako), stopwatch, gelas ukur (pyrex), cawan porselen 50 mL, tabung reaksi (pyrex) dan kaca arloji.

1.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb), stik pH, aluminium foil, plastik *wrap*, kertas cakram, propilenglikol, biakan murni bakteri *Stapylococcus aureus*, Ciprofloxacin 500 mg, etanol 96%, oleum citri, aquades, HCl 2 N, DMSO, pereaksi Dragendorff, HCl Pekat, FeCl₃ 0,1%, H₂SO₄ 1%, BaCl₂ 1% dan NaCl 0,9%.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Pembuatan ekstrak kemudian dilanjutkan dengan pembuatan *deodoran spray* ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb). Kemudian dilakukan uji evaluasi dan uji antibakteri. Variabel penelitian ini menggunakan penelitian eksperimen laboratorium antara lain:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja diubah untuk mempelajari pengaruh terhadap variabel terikat. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian yaitu konsentrasi ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) pada formulasi sediaan *deodoran spray*.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat yang digunakan pada penelitian ini yaitu evaluasi fisik dan daya hambat bakteri *Stapylococcus aureus* pada sediaan *deodoran spray* ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb).

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali merupakan variabel yang tidak berpengaruh terhadap variabel yang diteliti. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu pembuatan ekstrak, pembuatan *deodoran spray*, metode uji antibakteri, sterilisasi alat dan media pertumbuhan bakteri.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengumpulan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan daun pandan. Sampel tersebut diperoleh dari Desa Gembong Kulon, Kecamatan Talang, Kabupaten Tegal.

3.4.2 Determinasi Tanaman dan Hewan Uji

Determinasi dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Farmakologi Program Studi Farmasi Universitas Bhamada Slawi. Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas tanaman dan hewan uji yang akan digunakan pada penelitian.

3.4.3 Pembuatan Serbuk Daun Pandan

Ditimbang daun pandan seberat 7 kg kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran dan dicuci dengan air yang bersih. Setelah itu, dilakukan perajangan daun pandan yang dipotong secara kecil-kecil agar mudah dilakukan pengeringan. Tahapan pengeringan dilakukan dengan cara dioven pada suhu 40°C. Setelah kering yang ditandai dengan diremas menjadi hancur kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender sampai menjadi serbuk yang halus dan ditimbang beratnya (Dasopang & Simutuah, 2017).

3.4.4 Pembuatan Ekstrak Daun Pandan

Metode yang digunakan yaitu maserasi serbuk daun pandan sejumlah 1200 gram direndam dalam 4.800 mL etanol 96% (1:4), dilakukan dalam 3x24 jam dengan sehari sekali diaduk. Maserat disaring untuk mendapatkan sari satu. Remaserasi dilakukan dengan

perbandingan 1: 2 (b/v) selama 4x24 jam dengan sehari sekali diaduk, sampai diperoleh sari dua. Sari satu dan dua dikumpulkan dan pelarutnya dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* pada temperatur 50°C dan diuapkan kembali hingga diperoleh ekstrak kental (Valentina & Saryanti, 2023).

3.4.5 Rendemen

Hasil rendemen diperoleh dengan membandingkan antara berat ekstrak dengan berat bahan baku awal sebelum ekstraksi. Semakin tinggi nilai rendemen ekstrak maka semakin tinggi juga zat yang tertarik dari bahan baku (Senduk, Montolalu, & Dotulong, 2020).

Rumus rendemen sebagai berikut :

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

3.4.6 Standardisasi Ekstrak

a. Organoleptik

Ekstrak daun pandan diamati warna, bau, bentuk dan rasa secara organoleptik (Depkes, 2000).

b. Susut Pengeringan

Ditimbang 1 gram ekstrak lalu dikeringkan dioven dengan suhu 105°C selama 30 menit kemudian dimasukkan ke dalam botol, kemudian ekstrak diratakan dengan cara digoyangkan sampai terbentuk lapisan dengan tebal 5 sampai 10 mm lalu ditimbang. Selanjutnya, ekstrak dimasukkan dalam ruang

pengeringan, jika sudah kering buka tutup dan keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Catat bobot tetap yang diperoleh. Susut pengeringan tidak lebih dari 10% (Depkes, 2000). Rumus susut pengeringan sebagai berikut:

$$\% \text{ SP} = \frac{\text{Bobot ekstrak 1} - \text{Bobot ekstrak 2}}{\text{Bobot ekstrak 1}} \times 100 \%$$

Keterangan :

Bobot ekstrak 1 = bobot ekstrak sebelum penetapan.

Bobot ekstrak 2 = bobot ekstrak sebelum penetapan.

c. Kadar Air

Ditimbang 1 gram ekstrak kemudian diletakkan dan diratakan dalam alumunium foil, lalu dimasukkan ke dalam moisture analyzer pada suhu 105°C, dengan kadar air yang baik yaitu < 10% (Depkes, 2000).

3.4.7 Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Pandan

a. Uji Alkaloid

Ditimbang ekstrak daun pandan 0,5 gram kemudian ditambahkan 5 mL HCl 2N. Kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, setelah itu ditetaskan pereaksi dragendroff sebanyak 3 tetes. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan adanya endapan kuning jingga hingga merah bata (Handayani *et al.*, 2021).

b. Uji Flavonoid

Ditimbang ekstrak daun pandan 0,10 gram kemudian ditambahkan 5 mL aquades dan didihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 1 mL HCl pekat dan sedikit serbuk

Magnesium, lalu dikocok dan jika mengandung flavonoid maka akan menimbulkan warna merah, kuning atau jingga (Utami & Rosa, 2021).

c. Uji Tanin

Ditimbang 0,5 gram ekstrak daun pandan lalu dididihkan dengan 10 mL air dalam tabung reaksi, kemudian disaring. Teteskan sedikit FeCl_3 0,1% dan amati warna hijau kecoklatan atau warna hitam biru (Kayadoe *et al.*, 2015).

d. Uji Saponin

Ditimbang ekstrak daun pandan 2 gram kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan 10 mL air panas kemudian dikocok secara vertikal selama 10 detik yang menunjukkan adanya buih pada sampel. Kemudian ditambahkan dengan 1 tetes HCl 2N dan dikocok secara vertikal selama 10 detik. Hasil yang menunjukkan adanya saponin ditandai terbentuknya buih dengan tinggi 1-10 cm yang stabil selama minimal 10 menit (busa tidak hilang) menunjukkan adanya saponin (Rahmasiahi, Hadiq, & Yulianti, 2023).

3.4.8 Formulasi *Deodoran Spray*

Deodoran dibuat dengan 4 formulasi yang digunakan untuk formula F0 tanpa penambahan ekstrak yang digunakan sebagai kontrol negatif, sedangkan formula F1, F2 dan F3 menggunakan ekstrak dengan konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 40%, 45% dan 50%. Berikut formula yang digunakan :

Tabel 3.1 Formulasi *Deodoran Spray* Ekstrak Daun Pandan

Bahan	Konsentrasi (%b/v)				Range	Literatur	Fungsi
	F0	F1	F2	F3			
Ekstrak daun Pandan	-	40	45	50	-	(Utami & Rosa, 2021)	Zat Aktif
Etanol 96%	20	20	20	20	≤ 40	(Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009)	Pengawet
Propilenglikol	5	5	5	5	5-80 %	(Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009)	Kosolven
Gliserin	10	10	10	10	30%	(Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009)	Humektan
Pewangi	1	1	1	1	q.s	(Syamsiah, Priyantono, & Suharyani, 2016)	Pewangi
Aquades ad	20	20	20	20	-	-	Pelarut

3.4.9 Pembuatan Sediaan *Deodoran Spray* Ekstrak Daun Pandan

Dibuat 4 formula *deodoran spray* dengan perbedaan konsentrasi ekstrak daun pandan. Setelah bahan-bahan ditimbang ekstrak daun pandan dilarutkan terlebih dahulu dengan etanol 96% secukupnya, lalu dimasukkan ke dalam gelas beaker. Tambahkan propilenglikol, gliserin dan pewangi kemudian diaduk sampai homogen. Etanol 96% yang tersisa ditambahkan, aduk hingga homogen. Aquades ditambahkan hingga batas 20 mL, kocok perlahan sampai homogen, setelah itu botol dikemas dengan rapi (Indriaty *et al.*, 2022).

3.4.10 Uji Evaluasi Sediaan *Deodoran Spray* Ekstrak Daun Pandan

Tahap uji evaluasi sediaan *deodoran* ekstrak daun pandan dilakukan sebagai berikut :

3.4.10.1 Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk mengamati hasil sediaan deodoran terhadap warna, bau, dan bentuk sediaan (Meisani, Aulia, & Hardani, 2018).

3.4.10.2 Uji Homogenitas

Pengamatan sediaan deodoran dilakukan dengan mengamati ada tidaknya partikel yang terlihat atau partikel yang terpisah pada sediaan (Meisani, Aulia, & Hardani, 2018).

3.4.10.3 Uji pH

Penentuan pH dilakukan dengan menggunakan stik pH dengan cara stik pH dicelupkan ke dalam deodoran kemudian setelah tercelup sempurna angkat stik pH dan diukur dengan mencocokkan warna dengan warna pada tabel pH. Deodoran idealnya sesuai dengan pH kulit yang berkisar 4,5- 7,0 (Meisani, Aulia, & Hardani, 2018).

3.4.10.4 Uji Iritasi

Uji iritasi ini dilakukan pada hewan uji kelinci albino jantan atau betina yang sehat dengan berat sekitar 2 kg. Cara pengujian dilakukan dengan mengambil sediaan deodoran sebanyak 0,5 mL dan dioleskan dengan diameter 1 cm dari masing-masing sisi pada kulit kelinci yang telah dicukur seluas $2 \times 3 \text{ cm}^2$. Selanjutnya ditutup dengan plester non iritan. Kemudian diperban dan dibiarkan selama 24 jam.

Setelah 24 jam perban dibuka untuk mengamati adanya edema dan eritema. Penilaian respon dilakukan pada jam 24, 48 dan 72. Pengamatan eritema ditandai dengan gejala memerah pada bagian kulit dan adanya bercak-bercak kemerahan yang menonjol dan tersebar diseluruh tubuh. Pengamatan edema ditandai dengan gejala timbulnya pembengkakan akibat efek samping penggunaan sediaan topikal (Murti *et al.*, 2016).



Gambar 3.1 Bagian Pemaparan Sediaan
(Nawangsari, Prabandari, & Kurniasih, 2023)

Berikut ini skor derajat edema dan eritema (OECD, 2002) :

Tabel 3.3 Skor Derajat Eritema

No.	Reaksi	Skor
1.	Tidak ada eritema	0
2.	Eritema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
3.	Eritema terlihat jelas	2
4.	Eritema sedang sampai parah	3
5.	Eritema parah (merah daging) sampai pembentukan <i>eschar</i> yang menghambat penilaian eritema	4

Tabel 3.4 Skor Derajat Edema

No.	Reaksi	Skor
1.	Tidak ada edema	0
2.	Edema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
3.	Edema kecil (batas area terlihat jelas)	2
4.	Edema tingkat menengah (luasnya bertambah sekitar 1 mm)	3
5.	Edema parah (luas bertambah lebih dari 1 mm dan melebar melebihi area pemaparan oleh sediaan uji)	4

Masing-masing sampel iritan dihitung jumlah dari indeks edema dan eritema, selanjutnya dihitung indeks iritasi sebagai berikut (Ermawati, 2018):

$$\text{Indeks iritasi primer} = \frac{\text{Jumlah eritema 24,48,72 jam} + \text{jumlah edema 24,48,72 jam}}{\text{Jumlah kelinci}}$$

Indeks iritasi yang diperoleh selanjutnya dibandingkan dengan skor derajat iritasi seperti berikut (Ermawati, 2018):

Tabel 3.5 Skor Derajat Iritasi

No.	Evaluasi	Skor
1.	Tidak mengiritasi	0,0
2.	Sangat sedikit iritasi	0,1-0,4
3.	Sedikit iritasi	0,41-1,9
4.	Iritasi sedang	2,0-4,9
5.	Iritasi parah	5,0-8,0

3.4.11 Uji Aktivitas Antibakteri

3.4.11.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada saat melakukan difusi yang menggunakan alat-alat gelas yang sebelumnya harus dicuci kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan aluminium foil terlebih dahulu. Selanjutnya dilakukan proses sterilisasi fisik dengan

panas uap menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan sekitar 1 atm selama 15 menit (Nurhamidin, Fatimawali, & Antasionasti, 2021). Sterilisasi kimia dengan menggunakan alkohol untuk alat atau wadah sediaan yang tidak tahan panas, karena alkohol sebagai disinfektan yang membunuh bakteri dengan cara mendenaturasi protein dan merusak dinding sel (Nida *et al.*, 2021).

3.4.11.2 Pembuatan Media Agar Miring

Ditimbang Nutrient Agar (NA) sebanyak 2,8 gram dilarutkan dalam 100 mL aquades menggunakan erlenmeyer. Setelah itu dihomogenkan dengan batang pengaduk di atas penangas air sampai mendidih. Kemudian dituangkan sebanyak 3 mL pada 3 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil. Media tersebut disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dibiarkan pada suhu ruangan selama 30 menit sampai media memadat dengan posisi kemiringan 30°. Media agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Nurhamidin, Fatimawali, & Antasionasti, 2021).

3.4.11.3 Pembuatan Media Dasar

Ditimbang Nutrient Agar (NA) sebanyak 2,8 gram, lalu dilarutkan di dalam 100 mL aquades menggunakan erlenmeyer. Media lalu dihomogenkan dengan batang

pengaduk di atas penangas air sampai mendidih. Media yang sudah homogen ini disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah disterilkan, didinginkan hingga suhu dapat digunakan sesuai kebutuhan, media yang telah disterilkan bila tidak digunakan disimpan di dalam lemari pendingin (Nurhamidin, Fatimawali, & Antasionasti, 2021).

3.4.11.4 Pembiakan Bakteri

Pembiakan dilakukan dengan cara mengambil bakteri uji menggunakan jarum steril, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Nurhamidin, Fatimawali, & Antasionasti, 2021).

3.4.11.5 Pembuatan Larutan Standar 0,5 Mc. Farland

Pembuatan standar kekeruhan 0,5 Mc. Farland dibuat dari campuran H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL dan larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji dan setara dengan kepadatan bakteri 10⁸ CFU/mL (Nurhamidin, Fatimawali, & Antasionasti, 2021).

3.4.11.6 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Mengambil Bakteri uji yang telah diinokulasi dengan kawat steril kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang

berisi 10 mL larutan NaCl 0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* (Nurhamidin, Fatimawali, & Antasionasti, 2021).

3.4.11.7 Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pandan

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode Kirby-Bauer, yaitu metode difusi dengan cakram kertas. Larutan uji ekstrak daun pandan dengan konsentrasi 40%, 45%, dan 50% dibuat dengan cara menimbang ekstrak daun pandan sebanyak 0,4 gram, 0,45 gram dan 0,5 gram, masing-masing konsentrasi dilarutkan dalam 1 mL larutan DMSO 10%. Kertas cakram direndam dengan larutan ekstrak daun pandan dengan konsentrasi 40%, 45 % dan 50%, kemudian diletakkan di atas media Nutrien Agar yang telah dicampur dengan bakteri *Staphylococcus aureus*. Larutan DMSO 10% sebagai kontrol negatif . Cawan petri kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Lalu diamati zona hambat disekeliling kertas cakram dan diukur diameter zona hambat yang diperoleh dalam satuan milimeter menggunakan penggaris berskala (Angelina, Turnip, & Khotimah, 2015).

3.4.11.8 Uji Antibakteri Deodoran Ekstrak Daun Pandan

Medium NA dituang ke cawan petri sebanyak 10 mL, kemudian bakteri biakan *Staphylococcus aureus* dalam uji

diambil dengan pipet dari medium larutan NaCl 0,9% ke cawan petri steril sebanyak 200 µl. Cawan petri kemudian digoyang secara perlahan-lahan untuk menyebarkan biakan bakteri secara merata dan didiamkan hingga medium memadat. Kontrol positif menggunakan *Ciprofloxacin Antimicrobial Susceptibility Disks* (5µg). Cakram kertas yang telah direndam deodoran ekstrak daun pandan konsentrasi 40%, 45% dan 50%, dipindahkan dengan pinset steril ke medium NA berisi bakteri *Staphylococcus aureus* secara aseptis, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengamatan yang diperoleh yaitu ada atau tidaknya daerah bening yang menunjukkan kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri lainnya yang dinyatakan sebagai zona hambat disekeliling kertas cakram. Pengamatan diameter zona hambat yang terbentuk diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan penggaris berskala (Nurhamidin, Fatimawali, & Antasionasti, 2021).

Diameter zona hambat diukur dengan rumus :

$$\text{Zona hambat} = \frac{(\text{DV}-\text{DC}) + (\text{DH}-\text{DC})}{2}$$

(Winastri, Muliastri, & Hidayati, 2020).

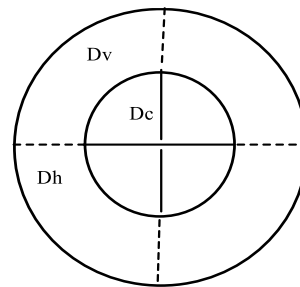
Keterangan :

DV = Diameter Vertikal

DC = Diameter Cakram

DH = Diameter Horizontal

Pengukuran diameter zona hambat dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 3.2 Pengukuran Diameter Zona Hambat
(Winastri, Muliastri, & Hidayati, 2020)

3.5 Analisis Data

Data penelitian uji aktivitas antibakteri sediaan *deodoran spray* ekstrak daun pandan dilakukan uji statistik yaitu uji *kruskal wallis* dengan menggunakan *Statistical Product and Servis Solution* (SPSS).