

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun trembesi (*Samanea saman (Jacq.) Merr.*) yang diambil dari Desa Jati Grombol, Jambangan, Mondokan, Sragen, Jawa Tengah.

##### **2. Sampel**

Sampel adalah suatu bagian dari populasi yang ada atau bagian yang diambil dengan kriteria tertentu, sehingga memenuhi syarat random dan representatif. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun trembesi (*Samanea saman (Jacq.) Merr.*) yang berwarna hijau, segar, tidak rusak dan terbebas dari hama. Tanaman ini diperoleh dari Desa Jati Grombol, Jambangan, Mondokan, Sragen, Jawa Tengah pada bulan Mei 2019

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun trembesi dalam formula emulgel antibakteri.

Variabel utama penelitian ini adalah aktivitas antibakteri sediaan emulgel ekstrak etanol daun trembesi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel bebas adalah yang sengaja dapat diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dari daun trembesi dalam berbagai konsentrasi serta formulasi sediaan emulgel ekstrak etanol.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol

dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium yang meliputi kondisi inkas, alat, dan bahan yang digunakan harus steril, media yang digunakan dalam penelitian, metode ekstraksi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah berupa organoleptis, pengamatan pH, stabilitas fisik gel (homogenitas), viskositas, daya lekat dan daya luas diameter daerah hambat yang dipengaruhi oleh ekstraksi daun trembesi dan apakah emulgel yang dihasilkan mengandung aktivitas antibakteri.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun dari trembesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr.) yang berwarna hijau dan segar di ambil dari Desa Jati Grombol, Jambangan, Mondokan, Sragen, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun trembesi adalah daun trembesi yang dicuci pada air yang mengalir, awal mula daun trembesi diangin-anginkan hingga kering dengan bantuan sinar matahari dilanjut menggunakan oven bersuhu 50°C kemudian digiling dan diayak dengan pengayakan no 40.

Ketiga, ekstrak etanolik adalah hasil ekstraksi dari serbuk daun trembesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr.) dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, sediaan emulgel antibakteri ekstrak etanol adalah emulgel yang sudah diformulasikan dengan daun trembesi dengan berbagai konsentrasi.

Kelima, bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat-alat yang digunakan adalah bejana maserasi dari bahan gelas, rotary evaporator, neraca analitik, autoklaf, inkubator, filter kertas saring, cawan uap, labu ukur, gelas kimia, pipet ukur, erlemeyer, batang pengaduk, waterbath, cawan

petri, cawan porselin, mortir, stamper, viscometer, tabung reaksi steril, mikropipet, jarum ose, vortex mixer, sentrifuge, jangka sorong, kawat platina, pinset, lampu pijar, botol semprot, mesh no 40, sendok tanduk, seperangkat alat uji daya sebar, pH meter, label, kertas aluminium foil.

## **2. Pemilihan bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun trembesi yang masih segar, berwarna hijau, air suling, HPMC, paraffin cair, span 80, tween 80, propilen glikol, propil paraben, metil paraben, emulgel yang ditabur dengan serbuk gentamisin sebagai kontrol positif.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi tanaman pada tahap ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun trembesi trembesi (*Samanea saman (Jacq.) Merr.*) dengan mencocokkan ciri dan morfologi tanaman yang akan diteliti untuk menghindari kesalahan dari tanaman yang digunakan untuk penelitian. Determinasi daun trembesi ini dilakukan di Balai Besar dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Karanganyar.

### **2. Pemilihan bahan**

Daun trembesi yang diambil dari Desa Jati Grombol, Jambangan, Mondokan, Sragen, Jawa Tengah. Daun trembesi dibersihkan dengan menggunakan air mengalir agar menghilangkan kotoran-kotoran lain yang melekat pada daun binahong. Daun trembesi yang telah dibersihkan dilanjutkan dengan proses pengeringan menggunakan oven pada suhu 50 °C dan dengan menggunakan bantuan sinar matahari sampai simplisia kering ditandai dengan daun pecah-pecah ketika diremas. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar kelembaban pada daun trembesi sehingga dapat mengurangi bahkan mencegah pembusukan yang disebabkan oleh mikroorganisme. Bahan yang sudah dikeringkan lebih mudah dihaluskan menjadi serbuk

### **3. Pembuatan serbuk**

Daun trembesi yang sudah kering kemudian digiling lalu diayak dengan ayakan no.40 dan kemudian disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup rapat.

### **4. Penetapan kadar kelembaban serbuk daun trembesi**

Penetapan kadar kelembaban serbuk daun trembesi dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi. Menggunakan alat *moisture balance*. Alat yang akan digunakan ditara terlebih dahulu dengan akurasi dan temperatur sesuai dengan jumlah simplisia yang diujikan. Timbang 2 gram serbuk daun trembesi lalu dimasukkan ke dalam alat tersebut kemudian dicatat hasilnya berupa angka dalam persen yang terdapat pada layar *moisture balance*, untuk meminimalisir kesalahan penetapan kadar kelembaban dilakukan sebanyak tiga kali.

### **5. Pembuatan ekstrak etanol daun trembesi**

Serbuk sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5 Liter sampai terendam sempurna, direndam selama 5 hari kemudian digojok 3 kali sehari. Hasil maserasi disaring dengan menggunakan kain flannel steril, setelah itu ampas dipisahkan dengan filtrat, kemudian ekstrak yang didapatkan dipisahkan dengan penyaringnya, yakni larutan etanol 96% dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut. Ekstrak daun trembesi yang pelarutnya sudah diuapkan lalu dipekatkan di oven sampai didapatkan ekstrak yang kental (Depkes RI 1995).

### **6. Uji bebas alkohol ekstrak etanol daun trembesi**

Uji bebas alkohol ekstrak etanol daun trembesi dilakukan untuk mengetahui bahwa ekstrak yang akan digunakan untuk penelitian benar-benar bebas dari alkohol, karena alkohol diketahui mempunyai aktifitas antiseptik yang dapat membunuh bakteri. Uji ini dilakukan dengan cara ekstrak diteteskan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan reagen  $H_2SO_4$  pekat dan  $CH_2SO_4$  lalu dipanaskan. Hasil uji bebas alkohol dari ekstrak tersebut kemudian ditandai dengan tidak adanya bau ester (Sayuti 2015).

## 7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun trembesi

Identifikasi kandungan kimia yang dimaksud adalah untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak etanol daun trembesi. Identifikasi yang dilakukan berupa identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin yang terkandung dalam ekstrak etanol daun trembesi. Pengujian fitokimia ekstrak etanol daun trembesi dapat dilakukan sebagai berikut:

**7.1 Identifikasi senyawa alkaloid.** Sampel dalam fase kromofom diambil sebagai kemudian diasamkan dengan  $H_2SO_4$  2M dan setelah itu ditambahkan larutan Mayer. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning (Setyowati *et al* 2014).

**7.2 Identifikasi senyawa flavonoid.** Sebagian ekstrak dalam fase air dimasukkan dalam tabung reaksi dan dimasukan bubuk magnesium, setelah itu di tetesi dengan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Hasil positif dinyatakan apabila ekstrak berubah berwarna merah atau jingga. Uji flavonoid juga dilakukan dengan penambahan NaOH. Adanya perubahan warna menjadi kekuningan menunjukan hasil positif uji flavonoid (Ismiyarto *et al* 2009).

**7.3 Identifikasi golongan senyawa saponin.** Sampel ekstrak dalam fase air dimasukan ke dalam tabung reaksi dan dikocok secara vertikal selama 10 detik. Terbentuknya busa setinggi 1-10 cm dan tidak hilang dengan penambahan HCl 2N selama 10 menit menandakan positif saponin (Yuningsih 2007).

**7.4 Identifikasi golongan senyawa tanin.** Ekstrak ditimbang sebanyak 0,1 gram ditambahkan 5 mL quadest kemudiaan didihkan selama 5 menit. Larutan ini disaring dan filtratnya ditambahkan dengan 5 tetes FeCl 1%. Uji tannin menunjukkan hasil positif jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan (Yuningsih 2007).

## 8. Formula Emulgel

Rancangan Formula Sediaan Emulgel dengan variasi ekstrak

**Tabel 1. Formula Emulgel**

	Gram (g)				
	F1	F2	F3	F4 (+)	F5 (-)
Ekstrak dari daun trembesi	2	4	6	-	-
HPMC	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Paraffin cair	5	5	5	5	5
Span 80	0,9	1,5	0,9	1,5	0,9
Tween 80	0,6	1	0,6	1	0,6
Propilen glikol	5	5	5	5	5
Propil paraben	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Metil paraben	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Gentamisin	-	-	-	0,1	-
Air suling ad	100	100	100	100	100

Keterangan:

- F I : emulgel dengan ekstrak daun trembesi sebanyak 2 %
- F II : emulgel dengan ekstrak daun trembesi sebanyak 4 %
- F III : emulgel dengan ekstrak daun trembesi sebanyak 6 %
- FIV : emulgel dengan serbuk gentamisin
- FV : emulgel tanpa ekstrak etanol daun trembesi

Tabel formula di atas terinspirasi dari jurnal karangan Arifin tahun 2015 dengan variasi ekstrak pada tiap formulanya. Pada kontrol positif menggunakan 0,1 % karena pada sediaan dipasaran tidak ada dalam bentuk emulgel gentamisin, sehingga dilakukan pembuatan emulgel gentamisin secara manual dengan konsentrasi yang sama dengan salep gentamisin pada pasaran yaitu 0,1 gram.

## 9. Pembuatan Sediaan Emulgel

Pembuatan emulgel dilakukan sesuai dengan komposisi formula yang tertera pada tabel 1. Masing-masing bahan basis emulgel ditimbang terlebih dahulu. Selanjutnya dilakukan pembuatan basis emulgel dengan cara: pembuatan emulsi, fase minyak dibuat dengan mencampurkan span 80 dan metil paraben dengan paraffin liquid pada suhu 70 °C. Fase air dibuat dengan mencampurkan propil paraben, aquadest, dan tween 80 dengan sebagian propilenglikol pada suhu 70°C. Fase minyak ditambahkan pada fase air suhu 70°C sambil terus diaduk dengan pengaduk sehingga terbentuk emulsi. Gel dibuat dengan mendispersikan HPMC sedikit demi sedikit dalam air panas dengan suhu 80°C, digerus sampai terbentuk basis gel. Kemudian emulsi dan gel yang sudah terbentuk dicampur

dengan homogenizer pada kecepatan 30 rpm selama 45 menit sampai terbentuk emulgel (Tri *et al.*2016) . Ditambahkan ekstrak pada basis emulgel yang telah jadi, kemudian homogenkan sampai emulgel tercampur rata dengan ekstrak.

## **10. Pembuatan Kontrol**

**10.1 Kontrol negatif.** Kontrol negatif yang digunakan adalah sediaan emulgel yang tidak mengandung ekstrak daun trembesi.

**10.2 Kontrol positif.** Kontrol positif yang digunakan adalah emulgel gentamisin buatan, dikarenakan emulgel gentamisin belum tersedia dipasaran, maka pada penelitian ini dibuatlah emulgel gentamisin dengan konsentrasi yang sama dengan sediaan salep gentamisin pada umumnya dengan konsentrasi yang sama pula sebesar 0,1 % .

**10.3 Kontrol normal.** Kontrol normal yang digunakan adalah emulgel ekstrak etanol daun trembesi dengan berbagai konsentrasi yaitu 2%, 4% dan 6% .

## **11. Pengujian sifat fisik sediaan emulgel**

**11.1 Uji organoleptik.** Uji Organoleptis berupa pemeriksaan konsistensi, warna, dan bau dari emulgel.

**11.2 Uji homogenitas emulgel.** Sediaan emulgel yang akan di uji dioleskan pada 5 buah gelas objek untuk diamati homogenitasnya pada mikroskop, apabila pada kelima objek gelas tersebut tidak terdapat butiran-butiran kasar, maka sediaan emulgel tersebut dikatakan homogen. Pengujian ini dilakukan pada hari pertama dan minggu ketiga.

**11.3 Uji pH emulgel.** Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dicelupkan kedalam masing-masing emulgel. Cara di atas diulangi sebanyak 3 kali pada formula masing-masing. Pengujian dilakukan pertama dan setelah penyimpanan selama 3 minggu.

**11.4 Uji viskositas emulgel.** Penetapan viskositas emulgel dilakukan dengan menggunakan viskotester VT-04. Pertama-tama sampel emulgel dimasukan pada chamber yang telah disediakan, alat Rotor mulai berputar jarum petunjuk viskositas akan bergerak secara otomatis menuju ke kanan, kemudian setelah petunjuk stabil. Viskositas dibaca dan satuannya adalah desi pascal second (d-pass). Pengukuran viskositas dimatikan kemudian pengujian dilakukan

replikasi sebanyak 3 kali untuk setiap emulgel yang diperiksa (Voigh 1984). Pengujian dilakukan pada saat minggu pertama dan setelah pengujian 3 minggu.

**11.5 Uji daya lekat emulgel.** Emulgel diletakkan diatas objek yang telah ditentukan luasnya. Gelas objek yang lain diletakkan diatas emulgel tersebut dan ditekan dengan beban 1 kg selama 1 menit, kemudian gelas objek dipasangkan pada alat test, selanjutnya beban seberat 80 gram dilepaskan dan catat waktunya sehingga kedua gelas objek tersebut terlepas. Percobaan di replikasi sebanyak 3 kali untuk setiap sediaan emulgel yang diuji (Voigh 1984). Pengujian dilakukan pada minggu pertama dan setelah penyimpanan selama 3 minggu.

**11.6 Uji daya sebar emulgel.** Pengujian daya sebar emulgel dilakukan dengan cara emulgel sebanyak 0,5 gram diletakkan di tengah alat (kaca bulat), bagian atas ditimbang terlebih dahulu dan diletakkan di atas massa emulgel, biarkan selama 1 menit, diukur diameter emulgel yang menyebar (amati panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi), ditambah 50 gram, 100 gram, 150 gram, dan 200 gram sebagai beban tambahan secara bertambah secara bertahap, setiap penambahan beban didiamkan selama 1 menit dan catat diameter emulgel yang menyebar seperti sebelumnya. Cara diatas diulangi untuk tiap formula emulgel yang diperiksa masing-masing 3 kali (Voigt 1984), pengujian dilakukan pada minggu pertama dan setelah pengujian selama 3 minggu.

**11.7 Uji stabilitas sediaan emulgel.** Pengujian dilakukan dengan metode *freeze thaw* yaitu dengan menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 48 jam kemudian dipindahkan ke suhu 40 °C selama 48 jam (satu siklus). Setelah itu dilanjutkan sampai 5 siklus, setiap satu siklus selesai, dilihat ada tidaknya pemisahan fase atau perubahan, uji pH dan uji viskositas emulgel (Priyani *et al* 2014).

## **12. Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus***

Pembuatan suspensi untuk difusi dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2 ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media Brain Heart Infusion (BHI) dan kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 setara dengan jumlah 1,5x10<sup>6</sup>cfu/mL. Tujuan di sesuikannya suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*



ATCC 25923 dengan *standar Mc Farland* 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

### **13. Identifikasi *Staphylococcus aureus***

**13.1 Identifikasi bakteri secara isolasi.** Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi pada media Vogel Johnson Agar (VJA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium telurit 1% dalam cawan petri dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan warna medium disekitar koloni kuning. Kemampuan *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi manitol membentuk suasana asam dan fenol red maka medium disekitar koloni berwarna kuning (Jawet *et al* 2007).

**13.2 Identifikasi morfologi secara pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram positif *staphylococcus aureus* menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol aseton = 1: 1 sebagai peluntur), dan Gram D (cat sarfianian sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan gram dilakukan dengan cara buat preparat ulasan yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarna, diamkan selama kurang lebih 1 menit cuci dengan aquadestilata mengalir kemudian di teteskan dengan gram B diamkan selama kurang lebih 1 menit dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan gram C diamkan selama kurang lebih 30 detik, di cuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit, cuci dengan aquadestilata mengalir kemudian keringkan preparat. Bakteri *Staphylococcus aureus* dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop.

**13.3 Identifikasi biokimia.** Uji ini terbagi menjadi dua cara yaitu katalase dan koagulase.

**13.3.a Uji Katalase.** Hasil positif pada bakteri secara isolasi kemudian ditambahkan 2-3 tetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara *Staphylococcus aureus* mempunyai katalase. Penambahan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akan terurai menjadi 2H<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>, hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara

**13.3.b Uji Koagulase.** Uji koagulase dapat dilakukan dengan cara menginokulasi koloni bakteri *Staphylococcus aureus* kedalam BHI 2 ml kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Inokulasi tersebut dipindahkan sejumlah 0,2 – 0,3 ml ke dalam tabung reaksi yang sudah disterilkan kemudian ditambahkan 0,5 ml koagulase plasma kemudian diaduk dan diinkubasi pada suhu 37°C. Diamati tiap jam sampai empat jam pertama dan dilanjutkan sampai 24 jam. Hal ini dimaksudkan untuk melihat atau mengecek koagulan yang terbentuk secara padat atau solid serta tidak jatuh apabila tabung dibalik dinyatakan positif bahwa bakteri tersebut memang *Staphylococcus aureus*.

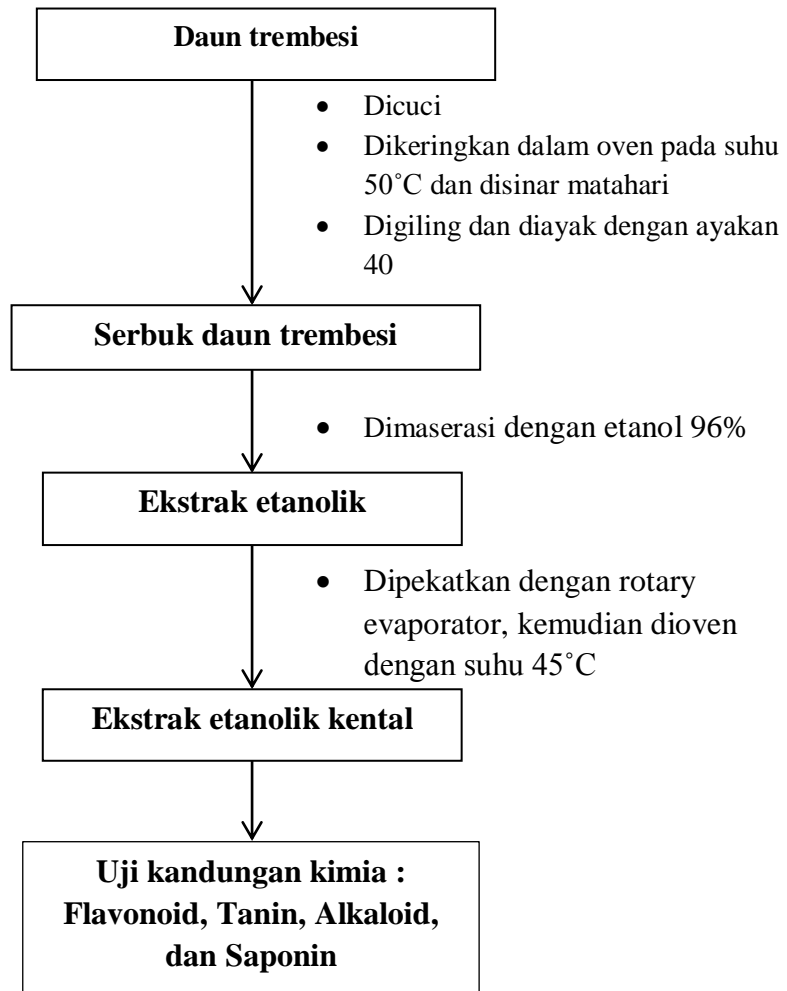
#### **14. Pengamatan daya kesembuhan efek antibakteri.**

Pengamatan daya kesembuhan dari efek antibakteri dilihat secara makroskopis untuk mengamati lamanya penyembuhan infeksi *Staphylococcus aureus* yang diinfeksi pada punggung kelinci setelah pemberian sediaan emulgel maksimal 7 hari, kemudian dianalisis di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Parameternya adalah mengecilnya diameter eritema dan keringnya luka pada kulit punggung kelinci. (Paju *et al*, 2013) Menggunakan Skor Tanpa eritema 0 ,sangat sedikit eritema (hampir tidak terlihat) 1 ,eritema jelas terlihat (diameter 25,1-30 mm) 2, eritema sedang (diameter 30,1-35 mm) 3, eritema berat (gelap merah dengan membentuk eskar, diameter > 35 mm)4,

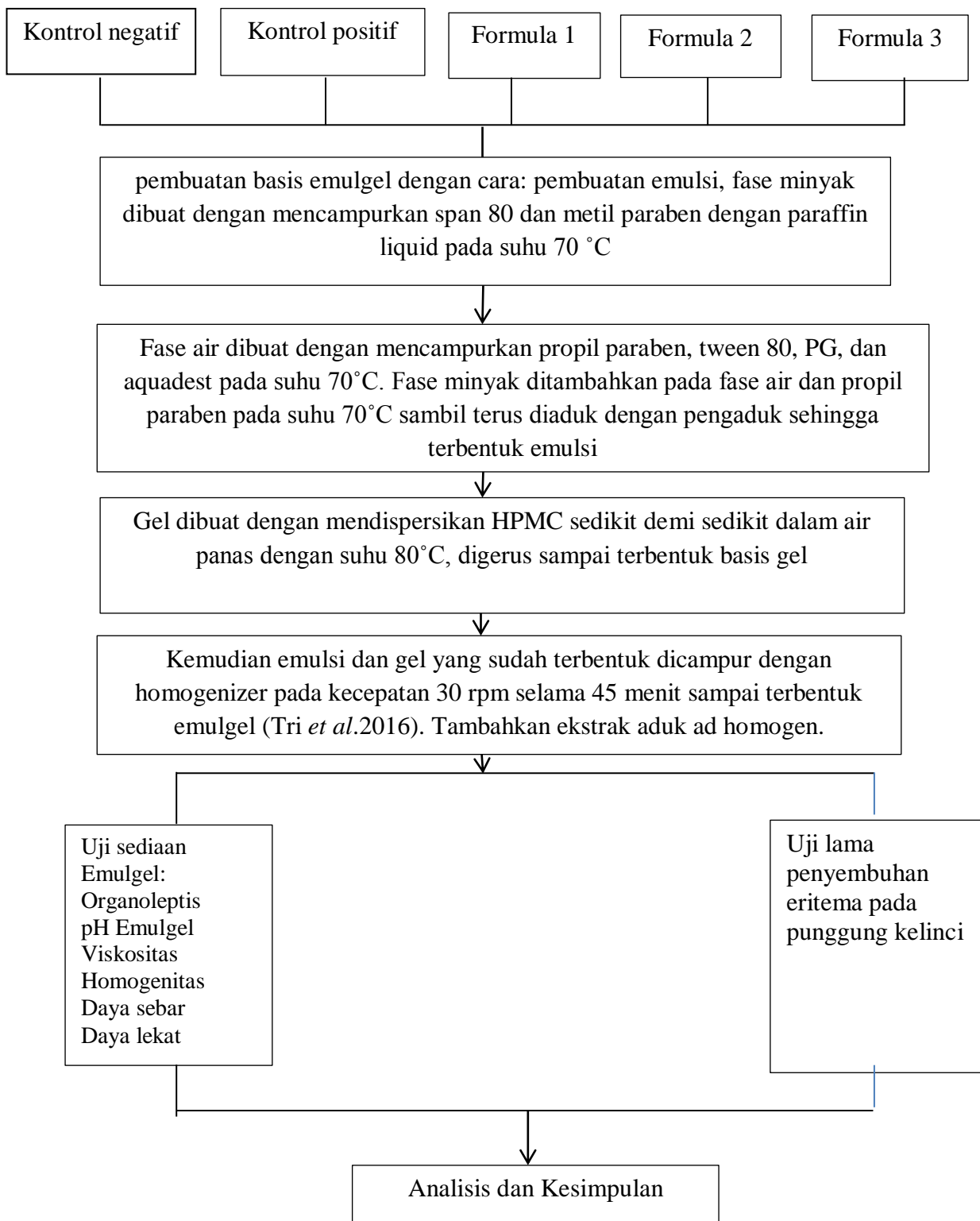
#### **D. Analisis Data**

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis secara statistik. Distribusi data diuji menggunakan Kolmogorov Smirnov. Jika data terdistribusi normal dilanjutkan dengan One Way Anova (dipengaruhi oleh 1 variabel) dan atau Two Way Anova (dipengaruhi oleh 2 variabel), jika terdapat perbedaan bermakna dilanjutkan dengan t-LSD (t-least significant deference).

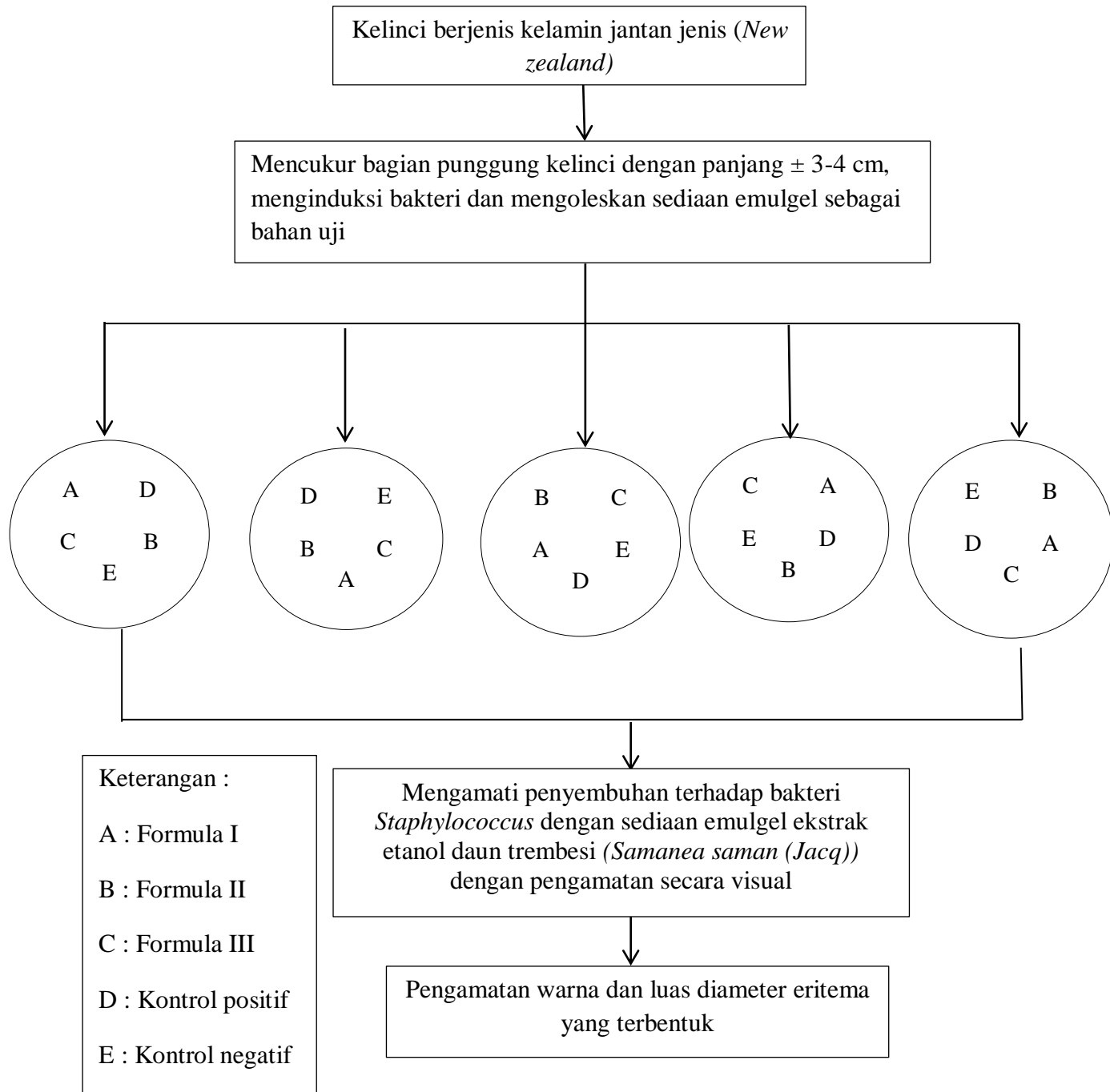
### E. Skema Penelitian



Gambar 8. Skema ekstraksi dengan daun trembesi (*Samanea saman* (Jacq) Merr)



Gambar 9. Skema pembuatan emulgel ekstrak daun trembesi



**Gambar 10.** Skema pengujian aktivitas emulgel ekstrak etanol daun trembesi (*Samanea saman*(Jacq) Merr) secara in vivo pada punggung kelinci