

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) yang masih segar dan bebas penyakit, bunga kuncup dan mekar, berwarna merah.

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

##### **1. Identifikasi variable utama**

Variable utama dalam penelitian ini adalah gel ekstrak bunga sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) yang dengan mendapatkan ekstraknya melalui maserasi dengan pelarut etanol 70% yang di ujikan pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

##### **2. Klasifikasi Variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja di ubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gel ekstrak bunga sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) dengan konsentrasi ekstrak dan karbopol yang berbeda.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kondisi bakteri, mutu fisik dan efektivitasnya

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulangi oleh penelitian lain secara tepat.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi bakteri yang meliputi suhu dan waktu inkubasi, kondisi steril, tempat tumbuh, kultur bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan kondisi laboratorium.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bunga sepatu yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk bunga sepatu adalah simplisia kering bunga sepatu yang dihaluskan dengan blender dan diayak dengan pengayak ukuran 40.

Ketiga, ekstrak bunga sepatu adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara maserasi serbuk bunga sepatu menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian diuapkan dengan evaporator dan dilanjutkan dengan oven untuk mendapatkan ekstrak kental.

Keempat, konsentrasi karbopol gel ekstrak bunga sepatu adalah gel yang dibuat dengan mencampurkan beberapa bahan tambahan untuk pembuatan gel ekstrak bunga sepatu.

Kelima, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri yang telah diperoleh dengan cara diinduksi

## C. Bahan, Alat dan Bakteri

### 1. Bahan

**1.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Provinsi Jawa Tengah.

**1.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan sebagai cairan penyari adalah etanol 70%. Bahan kimia yang digunakan untuk gel adalah ekstrak bunga sepatu, karbopol, Gliserin, trietanolamin, metyl paraben, dan aquadest.

### 2. Alat

Alat untuk membuat simplisia bunga sepatu seperti pisau, blender, ayakan no.40 dan oven. Alat untuk maserasi antara lain gelas ukur, corong kaca, gelas beaker, kain flanel dan botol berwarna gelap. Alat yang digunakan untuk bakteri adalah Tabung reaksi, masker, handscoon, cawan petri, jarum ose, Bunsen, gelas ukur, pipet tetes, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator.

### **3. Bakteri**

Bakteri uji yang digunakan yaitu biakan *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi bunga sepatu**

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi bunga sepatu. Determinasi ini dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian ini, selain determinasi harus diperhatikan pula ciri-ciri morfologi tanaman terhadap kepustakaan. Identifikasi tanaman bunga sepatu dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

### **2. Pembuatan serbuk bunga sepatu**

Bunga sepatu yang diperoleh disortasi dan dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel pada bunga. Bunga sepatu yang sudah dibersihkan kemudian dikeringkan dalam alat pengering (oven) hingga kering dengan tujuan untuk mengurangi kadar air dan mencegah pembusukan oleh mikroorganisme. Bunga sepatu yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan penggiling (blender) dan di ayak menggunakan pengayak no. 40 agar serbuk lebih halus dan lebih mudah untuk diekstraksi karena permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan cairan penyari makin halus. Serbuk dapat disimpan dalam wadah yang tertutup rapat dan kering (Depkes 2008).

### **3. Penetapan susut pengeringan**

Pengujian ini dilakukan dengan cara serbuk dari bunga sepatu ditimbang 2 gram, kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan alat *moisture balance* pada suhu 105°C selama 30 menit, selanjutnya dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Susut pengeringan memenuhi syarat dimana kadar lembab suatu serbuk simplisia < 10%.

#### 4. Pembuatan ekstrak bunga sepatu

Pembuatan ekstrak bunga sepatu menggunakan metode ekstraksi maserasi. Serbuk bunga sepatu ditimbang sebanyak 700 gram dimaserasi menggunakan 75 bagian cairan penyari yaitu sebanyak 5250 ml pelarut 70%. Maserasi dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan setiap 24 jam. Setelah 3 hari ekstrak ditampung dan pelarut etanol 70% diganti dengan yang baru. Hasil maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian dipekatkan kembali diatas *waterbath* hingga didapatkan ekstrak dengan kekentalan yang diinginkan (Nurul 2013).

#### 5. Uji organoleptis

Organoleptis ekstrak bunga sepatu diperoleh berdasarkan bentuk, warna dan bau dari ekstrak bunga sepatu.

#### 6. Uji bebas etanol

Pengujian bebas etanol dilakukan dengan cara dimasukkan sampel kedalam tabung reaksi, tambahkan asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol.

#### 7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak bunga sepatu

**8.1 Flavonoid.** Identifikasi flavonoid dilakukan dengan mengambil ekstrak sebanyak 0,05 g ditambahkan ke dalam 10 mL air. Campuran kemudian dipanaskan selama 5 menit, disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya filtrat ditambahkan 1 mL HCl pekat, 0,1 g serbuk Mg, dan 1 ml amil alkohol kemudian campuran dikocok kuat. Hasil positif adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alcohol (Prameswari *et al.* 2014).

**8.2 Saponin.** Sebanyak 1 mg bahan uji dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 10 ml air panas, lalu dikocok kuat sampai homogeny selama 10 detik. Terbentuk buih mantap selama tidak kurang dari 10 menit stinggi 1-10 cm, penambahan HCl 2N buih akan hilang (Prameswari *et al.* 2014).

**8.3 Antosianin.** Identifikasi antosianin dilakukan dengan dipanaskan dengan HCl 2M selama 5 menit pada suhu 100°C. Warna merah pudar maka menunjukkan adanya antosianin (Lydia 2011).

**8.4 Polifenol.** Identifikasi polifenol filtrat sampel ditambahkan pereaksi FeCl<sub>3</sub> dan menunjukkan warna hijau kecoklatan maka menunjukkan adanya tanin terkondensasi dan terbentuk warna selain warna ini menunjukkan adanya senyawa polifenol (Evi 2015).

**8.5 Alkaloid.** Identifikasi sebanyak 1 ml ekstrak etanol 70% buah atau sari buah dilarutkan dalam 10 ml klorofom dan 4 tetes NH<sub>4</sub>OH kemudian disaring dan filtratnya dimasukkan kedalam tabung reaksi bertutup. Ekstrak klorofom dalam tabung reaksi dikocok dengan 6 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M dan lapisan asamnya dipisahkan kedalam tabung reaksi yang lain. Lapisan asam diteteskan pada lempengan tetes dan ditambahaan dengan Mayer, Warger, dan Dragendorf yang akan menimbulkan endapan warna berturut-turut putih, coklat, dan merah jingga.

## 8. Pembuatan gel ekstrak bunga sepatu

**8.1 Pembuatan formula.** Menurut penelitian Nurul (2013) pengaruh variasi *gelling agent* karbopol 934 dalam sediaan gel ekstrak etanolik bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) terhadap sifat fisik gel dan aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus*.

**Tabel 1. Formula acuan gel**

Formula I	
Ekstrak bunga sepatu	15
Karbopol 934	1
Gliserin	5
Trietanolamin	1
Metyl paraben	0,2
Air ad	100

Nurul 2013

**Tabel 2. Variasi konsentrasi karbopol pada formula**

	Formula I	Formula II	Formula III	Kontrol -
Ekstrak bunga sepatu	15	20	25	-
Karbopol	1	1,5	2	1
Gliserin	5	5	5	5
Trietanolamin	1	1	1	1
Metyl paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Air ad	100	100	100	100

**8.1.1 Cara pembuatan gel.** Formulasi gel ekstrak bunga sepatu dimulai dengan tahap pengembangan karbopol dengan aquadest yang didiamkan selama

24 jam. Selanjutnya proses *mixing*, metyl paraben dilarutkan terlebih dahulu dengan aquadest dan gliserin secara berurutan kemudian tambahkan trietanolamin. Campuran ini kemudian ditambahkan pada karbopol yang telah dikembangkan lalu dilakukan proses *mixing* menggunakan mortir dengan skala putar yang stabil setelah terbentuk sediaan gel kemudian diwadahi dan ditutup dan disimpan pada suhu kamar.

**8.1.2 Uji Homogenitas gel.** Gel dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan yang cocok kemudian diamati apakah sediaan gel menunjukkan susunan yang homogen. Gel yang baik tidak terdapat butiran kasar (Veronika 2018).

**8.1.3 Uji daya menyebar gel.** Timbang 0,5 g gel, kemudian diletakkan ditengah alat (kaca bulat) kemudian timbanglah dahulu kaca yang satunya. Letakkan kaca tersebut diatas masa gel dan biarkan selama 1 menit. Lalu ukurlah berapa diameter gel yang menyebar (dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi) kemudian tambahkan 50 g beban tambahan, diamkan selama 1 menit dan catatlah diameter gel yang menyebar seperti sebelumnya. Kemudian teruskan dengan menambah tiap kali dengan beban tambahan 50 g dan catat diameter gel yang menyebar, setelah 1 menit. Kemudian ulangi masing-masing 3 kali untuk tiap gel yang tersisa. Kemudian buat grafik hubungan antara beban dan luas yang menyebar (Lena *et al.* 2015).

**8.1.4 Uji daya lekat gel.** Letakkan gel (secukupnya) diatas obyek glass yang telah ditentukan luasnya kemudian letakkan obyek glass yang lain diatas gel tersebut. Tekanlah dengan beban 1 Kg selama 5 menit dan pasanglah obyek glass pada alat uji kemudian lepaskan beban seberat 80 g dan catat waktunya hingga kedua obyek glass tersebut lepas kemudian ulangi sebanyak 3 kali Lakukan tes untuk formula gel yang lain dengan masing-masing 3 kali percobaan (Lena *et al.* 2015).

**8.1.5 Uji viskositas.** Pasanglah Viskotester pada klemnya dengan arah horizontal / tegak lurus dengan arah klem kemudian rotor kemudian dipasang pada viskotester dengan menguncikan berlawanan arah dengan jarum jam

kemudian masukkan sampel ke dalam mangkuk, kemudian alat dihidupkan. Catat berapa kekentalan sampel setelah jarum pada viskositas stabil.

**8.1.6 Uji pH.** Pengujian pH dilakukan menggunakan pH meter yang dikalibrasi menggunakan larutan dapar pH 7 dan pH4. Pengujian pH dengan cara gel ekstrak bunga sepatu ditimbang 1 gram kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 10 ml lalu diaduk sampai merata. Setelah itu pH meter dicelupkan kedalam larutan tersebut dan dicatat hasilnya (Veronika 2018).

**8.1.7 Uji Organoleptis.** Pengujian organoleptis yang diamatai yaitu bentuk gel (konsistensinya), warna, dan bau gel. Warna gel yang lebih baik yaitu yang berwarna menarik dan memiliki harum yang menyenangkan (Juwita 2013).

## **9. Sterilisasi alat**

Seluruh alat yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disterilkan terlebih dahulu. Alat seperti tabung reaksi, gelas ukur, erlemeyer, dan cawan petri dibungkus dengan kertas perkamen semuanya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam. Jarum ose disterilkan dengan nyala api Bunsen. Seluruh media pembenihan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

## **10. Pembuatan media MHA (*Mueller Hinton Agar*)**

Timbang 3,8 gram *Muller Hinton Agar* (38 gr/L) dengan komposisi medim (Beef Infusion 300 gr, Casamino acid 17,5 gr, Agar 17 gr) kemudian dilarutkan dalam aquadest dalam 100 ml aquadest. Panaskan hingga mendidih, sterilkan selama 15 menit di autoklaf dengan tekanan udara 1 atm suhu 121<sup>0</sup>C.

## **11. Identifikasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

**10.1. Identifikasi cawan gores.** Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi pada cawan petri yang telah berisi media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Penampakan membentuk koloni bulat dan halus dengan permukaan rata dan meninggi serta membentuk pigmen berwarna kehijauan.

**10.2. Identifikasi pewarnaan Gram.** Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat preparat oles *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Preparat ditetesi pewarna Kristal violet (Gram A)

sebanyak 2-3 tetes, didiamkan selama 1 menit. Kelebihan Kristal violet (Gram A) dibuang dengan memiringkan kaca objek di atas bak pewarna, bilas dengan air menggunakan botol pijit, kaca objek ditiriskan dikembalikan di atas rak. Larutan iodium (Gram B) sebanyak 2-3 tetes diteteskan pada preparat dengan memiringkan kaca objek, bilas kembali dengan air memakai botol pijit, cuci dengan etanol 95% (Gram C) setetes demi setetes selama 3 detik atau sampai zat ungu kristal tidak tampak lagi, cuci dengan air lalu tiriskan, beri safranin (Gram D) sebanyak 2-3 tetes selama 30 detik, buang safranin lalu bilas dengan air, tiriskan kaca objek dan serap kelebihan air dengan menekan kertas serap di atasnya. Hasil bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 digolongkan berbentuk batang, Gram negatif dengan warna sel merah ketika diamati di bawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100x dan lensa okuler dengan perbesaran 10x.

### **10.3. Identifikasi biokimia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.**

**10.3.1. Media SIM.** Cara identifikasi dengan biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji sulfida (-) untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, yaitu tidak terdapat warna hitam pada media, uji indol (-) yaitu tidak terbentuk warna merah pada bagian atasnya setelah ditambahkan dengan reagen Erlich, uji motilitas (+) yaitu pertumbuhan bakteri yang menyebar pada media.

**10.3.2. Media KIA.** Cara identifikasi dengan biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfide. Hasil K/KS<sup>-</sup> untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah bagian lereng berwarna merah dituliskan K, bagian dasar berwarna merah dituliskan K, sulfida negatif yaitu tidak terbentuk warna hitam pada media yang ditulis S<sup>-</sup>.

**10.3.3. Media LIA.** Cara identifikasi yaitu dengan biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil K/KS<sup>-</sup> untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC



27853 yaitu lereng akan berwarna ungu ditulis K, dasar berwarna ungu ditulis K, dan sulfide negative yaitu terbentuknya warna hitam pada media ditulis S<sup>-</sup>.

**10.3.4. Uji Citrat.** Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru.

## **12. Pembuatan suspensi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan dengan mengambil 1 ose biakan murni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, dimasukkan kedalam tabung yang berisi 5 ml *Brain Heart Infusion* (BHI), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kekeuhannya disetarakan dengan larutan standar Mc. Farland 0,5 (kekeuhan setara dengan Mc. Farland 0,5 mempunyai populasi  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL).

## **13. Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Difusi**

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi digunakan untuk mengetahui adanya daya hambat terhadap bakteri uji dan untuk menentukan diameter daerah hambat dari gel ekstrak bunga sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) dengan langkah kerja sebagai berikut :

Pertama bakteri yang sudah distandarkan dengan MC Farland 0,5 diambil dengan kapas lidi steril sebanyak satu kali kemudian dioleskan pada cawan petri yang berisi MHA dan tunggu sampai bakteri berdifusi pada media, setelah bakteri yang setara dengan MC Farland 0,5 dioleskan dengan rata pada cawan petri yang berisi MHA, kemudian pada setiap cakram yang berukuran 6 mm ditetesi menggunakan mikropipet 50 µm dengan larutan gel bunga sepatu *Gelling agent* karbopol yang mempunyai konsentrasi yang berbeda-beda. Kontrol positif menggunakan gentamisin. Kontrol negatif menggunakan basis gel tanpa ekstrak. Setelah itu cakram di diletakan atau ditempelkan pada media MHA dengan menggunakan pinset, cawan petri diinkubasi didalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian mengukur diameter zona hambat pada masing-masing sumuran menggunakan jangka sorong digital dengan pengukuran sebanyak 3 kali

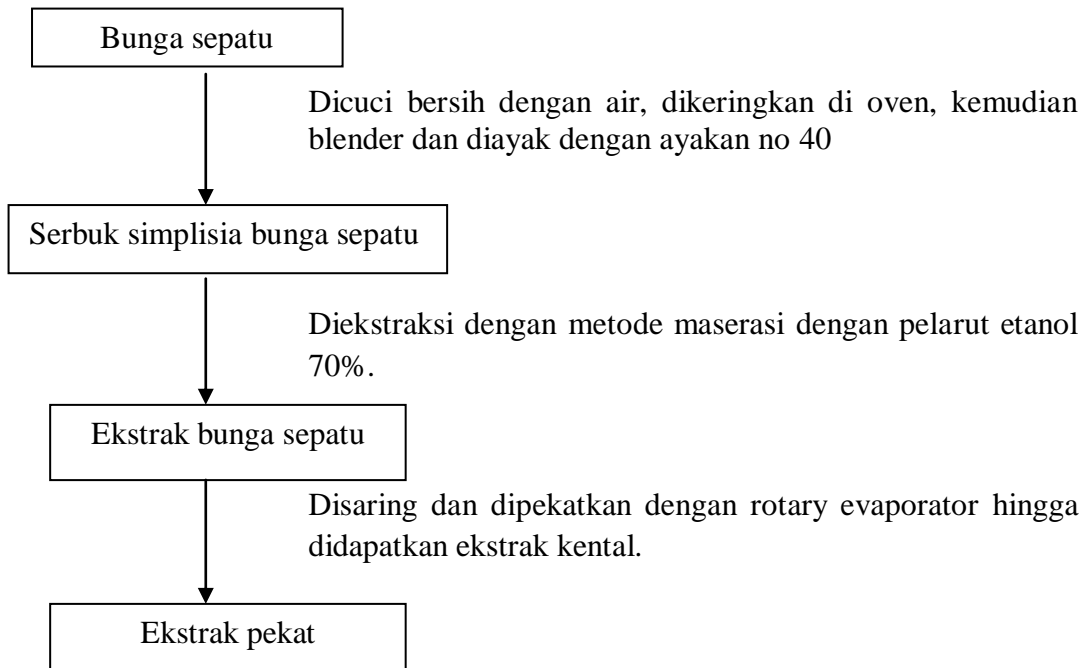
untuk tiap lubang lalu replikasi dilakukan sebanyak 3 kali pada tiap pengujian. Nilai diameter zona hambat dari kedua replikasi tersebut dirata-rata kemudian membandingkan nilai diameter zona hambat antar bakteri uji.

### **E. Analisis Hasil**

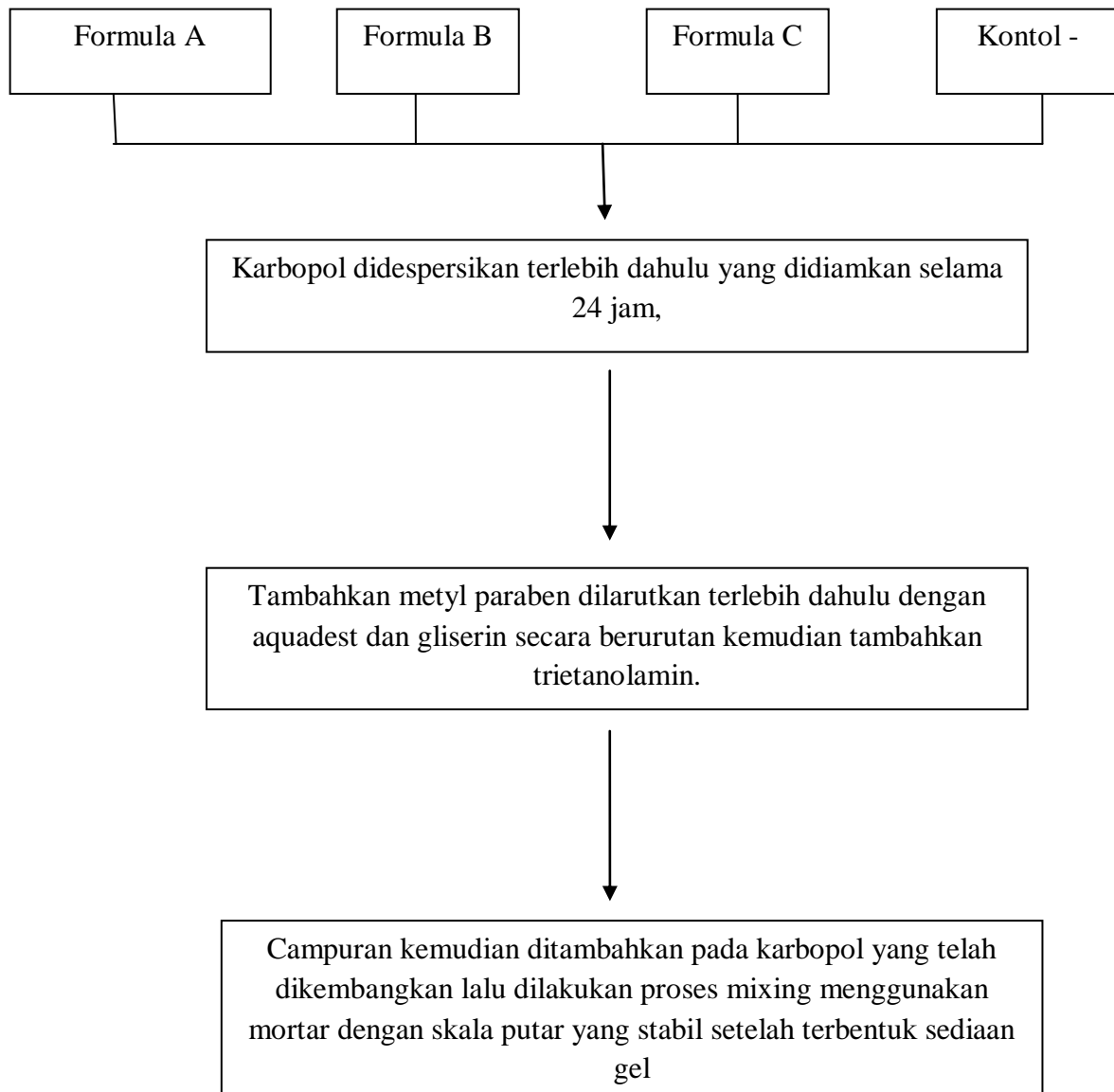
Pengamatan hasil aktivitas antibakteri gel ekstrak bunga sepatu dilakukan dengan mengukur diameter daya hambat (DDH). Data yang diperoleh dianalisis dengan bantuan alat analisis *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) menggunakan uji *one way* ANOVA dan membandingkan dengan tabel kategori daya hambat bakteri untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri gel ekstrak bunga sepatu.

Pertama apabila diperoleh nilai signifikansi  $>$  taraf signifikansi (0,05) maka  $H_0$  diterima, yang berarti tidak ada perbedaan aktivitas antibakteri yang signifikan gel ekstrak bunga sepatu dengan *Gelling Agent* karbopol yang mempunyai konsentrasi yang berbeda terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Kedua apabila diperoleh nilai signifikansi  $<$  taraf signifikansi (0,05) maka  $H_0$  ditolak, yang berarti ada perbedaan aktivitas antibakteri yang signifikan gel ekstrak bunga sepatu dengan *Gelling Agent* karbopol dengan konsentrasi yang berbeda terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

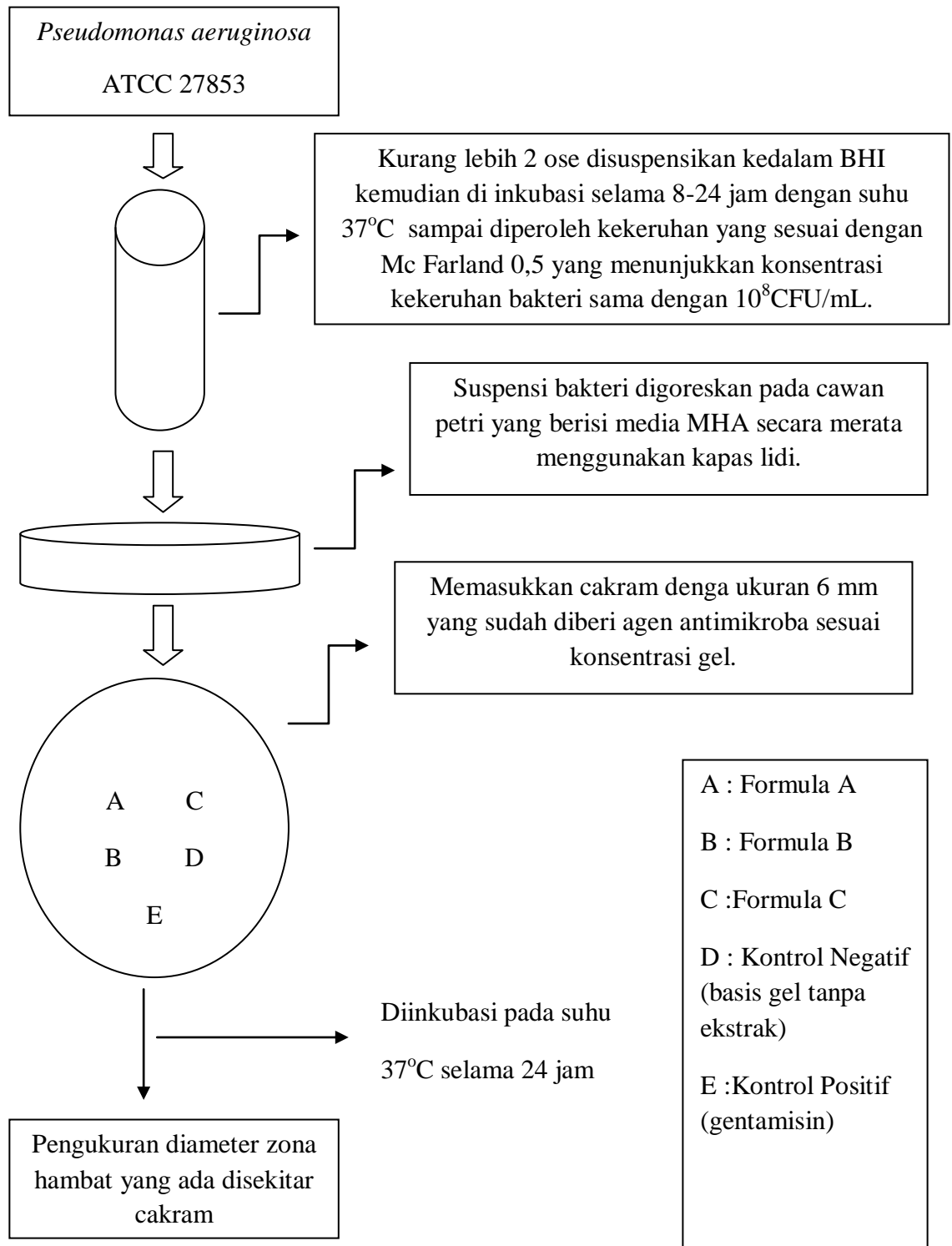


**Gambar 8.** Pembuatan ekstrak bunga sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)



**Gambar 9. Cara pembuatan gel ekstrak bunga sepatu**

Formula A konsentrasi karbopol 1 % dengan ekstrak 15%  
Formula B konsentrasi karbopol 1,5 % dengan ekstrak 20%  
Formula C konsentrasi karbopol 2 % dengan ekstrak 25%  
Kontrol negatif basis gel tanpa ekstrak bunga sepatu



Gambar 10. Uji aktivitas antibakteri