

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.) yang diambil dari Kelurahan Sambung Macan, Kabupaten 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 beluntas yang sudah tua, yang berwarna hijau, segar, tidak rusak dan terbebas dari hama. Tanaman ini diperoleh dari kelurahan Sambung Macan, Kabupaten Sragen, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun beluntas dalam formula gel *hand sanitizer*.

Variabel utama penelitian ini adalah aktivitas antibakteri sediaan gel *hand sanitizer* ekstrak etanol daun beluntas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas adalah yang sengaja dapat diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol dari daun beluntas dalam formulasi sediaan gel *hand sanitizer*.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu diterapkan 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*. Kondisi laboratorium yang meliputi kondisi inkas, alat, dan bahan yang digunakan harus steril, media yang digunakan harus steril, media yang digunakan dalam penelitian, metode ekstraksi.

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

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun beluntas tua yang berwarna hijau dan segar diambil dari kelurahan Sambung Macan Kabupaten Sragen Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun beluntas adalah daun beluntas yang dicuci pada air yang mengalir, daun beluntas diangin-anginkan hingga kering, tanpa menerima cahaya matahari secara langsung dengan kemudian digiling dan diayak dengan pengayak no 60.

Ketiga, ekstrak etanolik adalah hasil ekstrak dari daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 80%.

Keempat, sediaan gel *hand sanitizer* ekstrak etanol adalah *hand sanitizer* yang sudah diformulasikan dengan daun beluntas dengan berbagai konsentrasi.

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

Keenam, uji aktivitas antibakteri adalah uji yang ditentukan dengan metode difusi dengan mengukur luar daerah hambatan atau daya hambat pertumbuhan bakteri menggunakan kontrol negatif DMSO 5% dan kontrol positifnya adalah gel *hand sanitizer* detol. Dengan kandungan ekstrak etanol.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah bejana maserasi dan bahan gelas, rotari 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, viskometer, tabung reaksi steril, mikropipet, jarum ose, vortex mixer, sentrifuge, jangka sorong, kawat platina, pinset, lampu pijar, botol semprot, mesh no 60, sendok tanduk, seperangkat alat uji daya sebar, ph meter, label, kertas alumunium foil.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun beluntas yang masih segar, air suling, etanol 80%, CMC Na, propilen glikol, metil paraben, DMSO 3%, media *brain heart infusion* (BHI), media *vogel johnson agar* (VJA), kristal violet, lugol iodine, safranin.

D. Jalanya Penelitian

1. Identifikasi tanaman

Identifikasi tanaman yang pertama kali dilakukan adalah determinasi tanaman, dimana determinasi tanaman pada tahap ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun beluntas (*Pluchea indica* L.) Determinasi dilakukan dengan mencocokkan ciri dan morfologi tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi untuk menghindari kesalahan dari tanaman yang digunakan untuk penelitian. Determinasi daun beluntas dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Sebelas Maret.

2. Pemilihan bahan daun beluntas

Daun beluntas diambil dari kelurahan Sambung Macan Kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Daun beluntas disortasi dan dipilih yang utuh masih berwarna hijau dan tampak segar dipisahkan dari tangkainya kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih, daun yang bersih kemudian di jemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutup kain hitam, penjemuran dilakukan beberapa hari sampai daun kering.

3. Pembuatan serbuk

Daun beluntas yang sudah kering kemudian dibuat serbuk dengan alat pembuat serbuk kemudian diayak dengan ayakan no 60. Serbuk ditimbang lagi untuk menentukan bobot persen kering terhadap bobot basah kemudian disimpan dalam wadah yang kering kemudian ditutup rapat.

4. Penetapan kadar lembab serbuk beluntas

Penetapan kadar lembab serbuk daun beluntas dilakukan susut pengeringan 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 beluntas lalu diukur kadar air dari serbuk dengan menggunakan alat *moisture balance* dengan suhu 105⁰C. Penandaan hasil analisa setelah selesai yaitu sampai diperoleh bobot konstan yang dilakukan penimbangan sebanyak tiga kali kemudian dicatat hasilnya berupa angka dalam persen yang terdapat pada layar *moisture balance*. Kadar susut pengeringan memenuhi syarat dimana suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Voight 1994)

5. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 80%. Dengan perbandingan 1:10 Setiap 750 gram serbuk daun beluntas diekstraksi dengan 7500 ml pelarut etanol 80%. Serbuk dimasukkan dalam botol gelap yang berisi pelarut kemudian ditutup. direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Seteh itu maserat dipisahkan dengan cara dekantasi. Ulangi proses penyarian dengan etanol 80% sebanyak 3750 ml untuk mencuci sisa ekstrak yang tertinggal dibotol. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya menggunakan *vaccum rotary evaporator* pada suhu 50⁰C hingga diperoleh ekstrak kental. (Farmakope Herbal Indonesia 2008)

6. Penetapan organoleptis ekstrak daun beluntas

Penetapan organoleptis ekstrak daun beluntas dilakukan dengan mengamati bentuk, warna dan bau dari ekstrak etanol 80% daun beluntas.

7. Uji bebas alkohol ekstrak etanol daun beluntas

Pemeriksaan bebas etanol terhadap ekstrak pekat daun beluntas bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak pekat tersebut bebas dari etanol dengan reaksi

esterifikasi. Caranya dengan menambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat kedalam tabung reaksi yang berisi ekstrak kemudian dipanaskan, jika tercium bau ester yang khas dari alkohol maka ekstrak masih mengandung etanol (Preparandi 1987).

8. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun beluntas

Identifikasi kandungan kimia yang dimaksudkan adalah untuk menetapkan kandungan kimia dalam ekstrak daun beluntas. Identifikasi yang dilakukan berupa identifikasi senyawa flavonoid alkaloid dan saponin.

8.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak daun beluntas sebanyak $\pm 0,5$ gr dicampur dengan aquades. Setelah itu dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat ditambah 0,5 mg bubuk Mg dan ditambahkan 1 ml HCl pekat dan amil alkohol. Dicampur dan dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah *et al.* 2014)

8.2. Identifikasi alkaloid. Ekstrak etanol beluntas sebanyak $\pm 0,5$ g dilarutkan dengan aquadest. Setelah itu ditambahkan 1 ml HCl 2 N. Dibuat dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambah reagen mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung 2 ditambah reagen Dragendrof terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Alamsyah *et al.* 2014)

8.3. Identifikasi saponin. 5 ml ekstrak kental dididihkan dalam penangas air selama 5 menit, setelah dingin kemudian disaring, filtrat dikocok kuat dengan arah vertikal selama 1-2 menit senyawa saponin ditunjukkan dengan adanya busa setinggi 1 cm yang stabil setelah dibiarkan selama 1 jam atau pada penambahan 1 tetes HCl 2 N (Depkes 1977)

9. Rancangan formulasi gel *hand sanitizer* ekstrak etanol daun beluntas

Tabel 1 Formulasi *hand sanitizer* ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.)

Bahan	Formula	Formula	Formula	Formula IV
	I	II	III	
Ekstrak	0	12	24	36
CMC	0,25	0,25	0,25	0,25
Propilen glikol	4	4	4	4
metil paraben	0,1	0,1	0,1	0,1
aquadest ad	50	50	50	50

Keterangan : Formula I : *hand sanitizer* dengan konsentrasi ekstrak 0%
Formula II : *hand sanitizer* dengan konsentrasi ekstrak 12%

Formula III: *hand sanitizer* dengan konsentrasi ekstrak 24%.

Formula IV : *hand sanitizer* dengan konsentrasi ekstrak 36%

10. Pembuatan sediaan gel

Disiapkan mortir dan stampher, CMC-Na yang sudah ditimbang ditaburkan diatas aquades, diaduk homogen sampai membentuk massa gel, metil paraben yang sudah ditimbang dilarutkan dalam sebagian propilen glikol diaduk sampai homogen, kemudian dicampur dengan basis yang sudah dikembangkan, aduk dengan kecepatan yang stabil hingga homogen, kemudian ditambahkan dengan aquadest sambil diaduk sampai homogen. Ekstrak etanol daun beluntas ditambahkan sedikit demi sedikit sambil tetap diaduk sampai homogen.

11. Pengujian sifat fisik sediaan gel

11.1. Uji organoleptik. Uji organoleptis berupa pemeriksaan konsistensi, warna, dan bau dari gel. Uji organoleptis dilakukan dengan pengamatan langsung secara virtual dan panca indra.

11.2. Uji homogenitas gel. Sediaan gel yang akan diuji dioleskan pada 5 buah gelas objek untuk diamati homogenitasnya pada mikroskop, apabila pada kelima objek glas tidak terdapat butiran-butiran kasar, maka sediaan gel tersebut dikatakan homogen. Pengujian ini dilakukan pada hari ke-0 sampai hari ke-21 (Sharon *et al.* 2013)

11.3. Uji pH gel. Penentuan pH. Sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dicelupkan kedalam masing-masing gel *hand sanitizer*. Cara diatas diulangi pada formula masing-masing. Pengujian dilakukan pertama dan setelah penyimpanan selama 3 minggu (Sharon *et al.* 2013).

11.4. Uji viskositas gel. Uji viskositas gel dilakukan dengan menggunakan alat viskometer VT-03. Bagian cup diisi dengan massa gel yang akan diuji viskositasnya, kemudian alat dinyalakan. Viskositas gel dapat diketahui setelah jarum skala pada viskometer stabil. Satuan viskositas yang telah dikalibrasi menurut JLS 28809 adalah *desipaskal-second* (dPas), setelah pengukuran selesai, alat viskometer dimatikan. Pengujian viskositas ini dilakukan sebanyak tiga kali tiap formulanya. Pengujian pertama dilakukan di hari pertama gel dibuat, dan diuji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al.* 2013).

11.5. Uji daya lekat. Uji daya lekat gel dilakukan dengan mengoleskan 0,25 gram gel diatas objek glass yang kemudian ditutup dengan objek glass lain. Objek glass tersebut diletakkan kemudian diberi beban 1 kg selama 5 menit, kemudian dipasang pada alat uji. Beban seberat 1 kg dilepaskan dari alat tersebut dan dicatat waktu pelepasan kedua objek glass yang melekat. Pengujian daya lekat gel diulangi sebanyak 3 kali tiap formulanya. Pengujian pertama dilakukan pada hari pertama gel dibuat, dan diuji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al.* 2013).

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

12. Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi untuk difusi dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2 ose bakteri *Staphylococcus aureus*. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media *brain heart infusion* (BHI) dan kekeruhanya di sesuaikan dengan kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 setara dengan jumlah $1,5 \times 10^6$ cfu/mL. Tujuan di sesuaikannya suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 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 diinkubasi 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 susana asam dan fenol red maka medium disekitar koloni berwarna kuning. Koloni berwarna hitam karena *Staphylococcus aureus* dapat mereduksi telurit (Jawetz *et al.* 2007).

13.2. Identifikasi morfologi secara pewarnaan gram. Pewarnaan gram positif *Staphylococcus aureus* menggunakan gram A (kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol aseton = 1:1 sebagai peluntur), dan Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan gram dilakukan dengan cara buat preparat ulasan yang telah difiksasi, kemudian ditetesi dengan gram A sampai semua ulasan berwarna. Diamkan selama kurang lebih 1 menit, cuci dengan aquades mengalir. Teteskan preprat dengan gram B, lalu diamkan selama kurang lebih 1 menit dan dikering anginkan. Preparat dilunturkan dengan gram C dan diamkan selama kurang lebih 30 detik, dicuci dengan aquades mengalir. Tetesi preparat dengan Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit, cuci dengan aquades mengalir, kemudian kering anginkan. Preparat bakteri *Staphylococcus aureus* dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop (Volk & Wheeler 1988).

13.3. Identifikasi biokimia secara fisiologi. Identifikasi biokima secara fisiologi ada 2 cara yaitu katalase dan koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakeri uji yang ditanam pada larutan media *brain heart infusion* (BHI). Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara *Staphylococcus aureus* mempunyai katalase. Penambahan H_2O_2 akan terurai menjadi $2H_2$ dan O_2 hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara ((Jawetz *et al.* 2007).

Uji koagulase dilakukan dengan cara menginokulasi koloni bakteri *Staphylococcus aureus* kedalam BHI 2 ml kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu $37^{\circ}C$. Inokulasi tersebut dipindahkan sejumlah 0,2-0,3 ml kedalam tabung reaksi yang sudah disterilkan kemudian ditambahkan 0,5 ml koagulase plasma kemudian diaduk dan diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ diamati tiap jam sampai 4 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* (Jawetz *et al.* 2007).

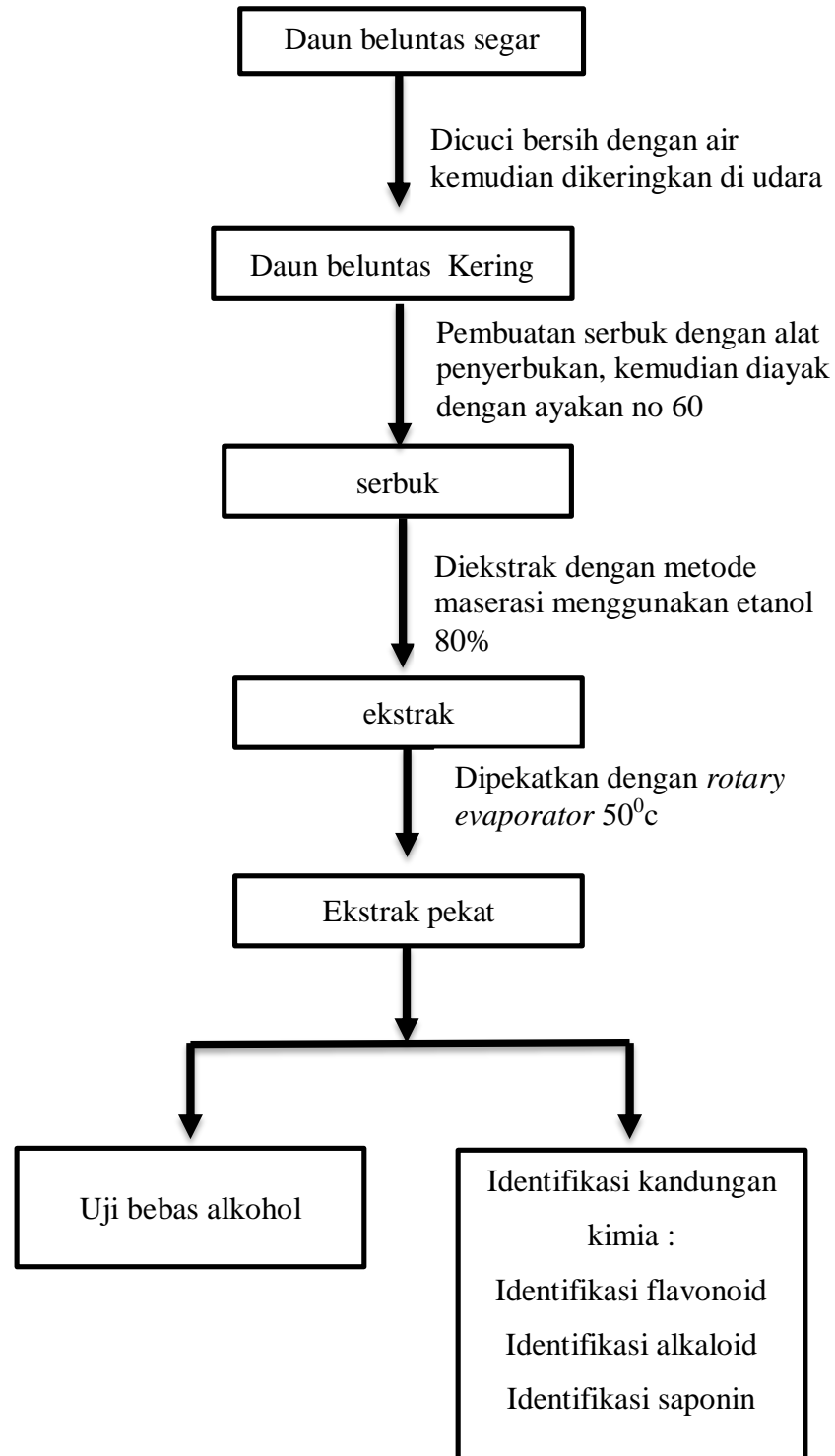
14. Pengujian Aktivitas formula *hand sanitizer* ekstrak daun beluntas

Uji aktivitas antibakteri sediaan gel *hand sanitizer* dilakukan untuk mengetahui apakah sediaan gel *hand sanitizer* ini mampu membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Metode ini menggunakan suatu cakram kertas saring (paper disc) yang berfungsi tempat menampung zat antimikroba yaitu gel *hand sanitizer* ekstrak daun beluntas. Dimana formula gel *hand sanitizer* ekstrak daun beluntas yang telah dibuat dalam berbagai konsentrasi dimana disetiap formulanya mengandung ekstrak sebesar 0%, 12%, 24%, 36%, serta kontrol positif (*hand sanitizer* dettol) dan kontrol negatif (DMSO 3%) kertas cakram tersebut kemudian di celupkan dalam larutan stok dan kemudian di letakkan pada cawan petri yang telah terisi media MHA dan sudah diinokulasi bakteri uji, replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Lalu cawan diinkubasi pada suhu 37⁰c selama 18-24 jam, kemudian lakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram menandakan bahwa formula gel *hand sanitizer* ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica. L*) memiliki daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

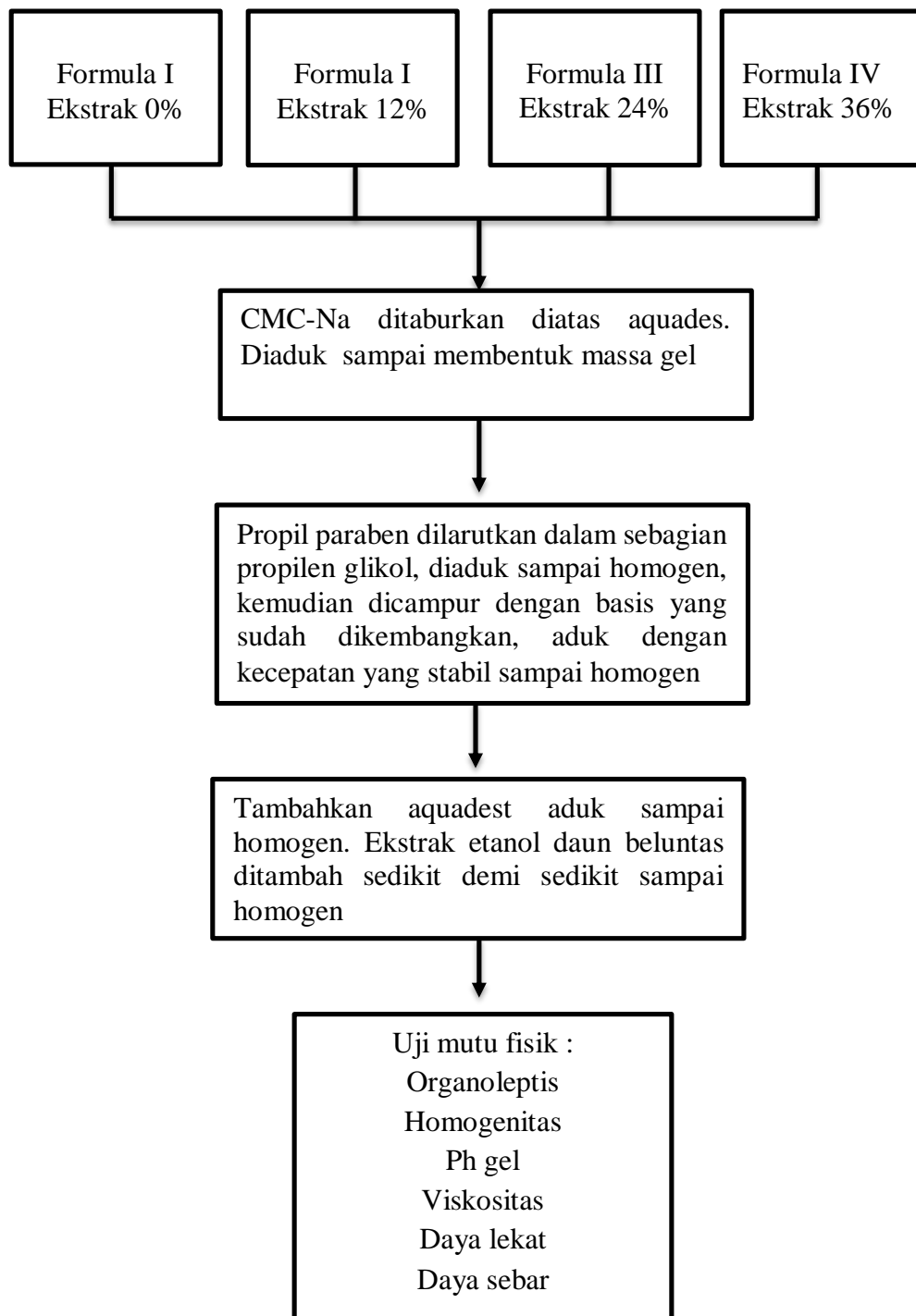
E. Analisis Data

Data hasil penelitian yang didapat berupa organoleptis, homogenitas, viskositas, pemeriksaan pH, dan uji aktivitas. Data hasil penelitian dianalisis secara statistik. Distribusi data diuji menggunakan one sample *kolmogrov smirnov* dan *one way anova* dengan program SPSS for window.

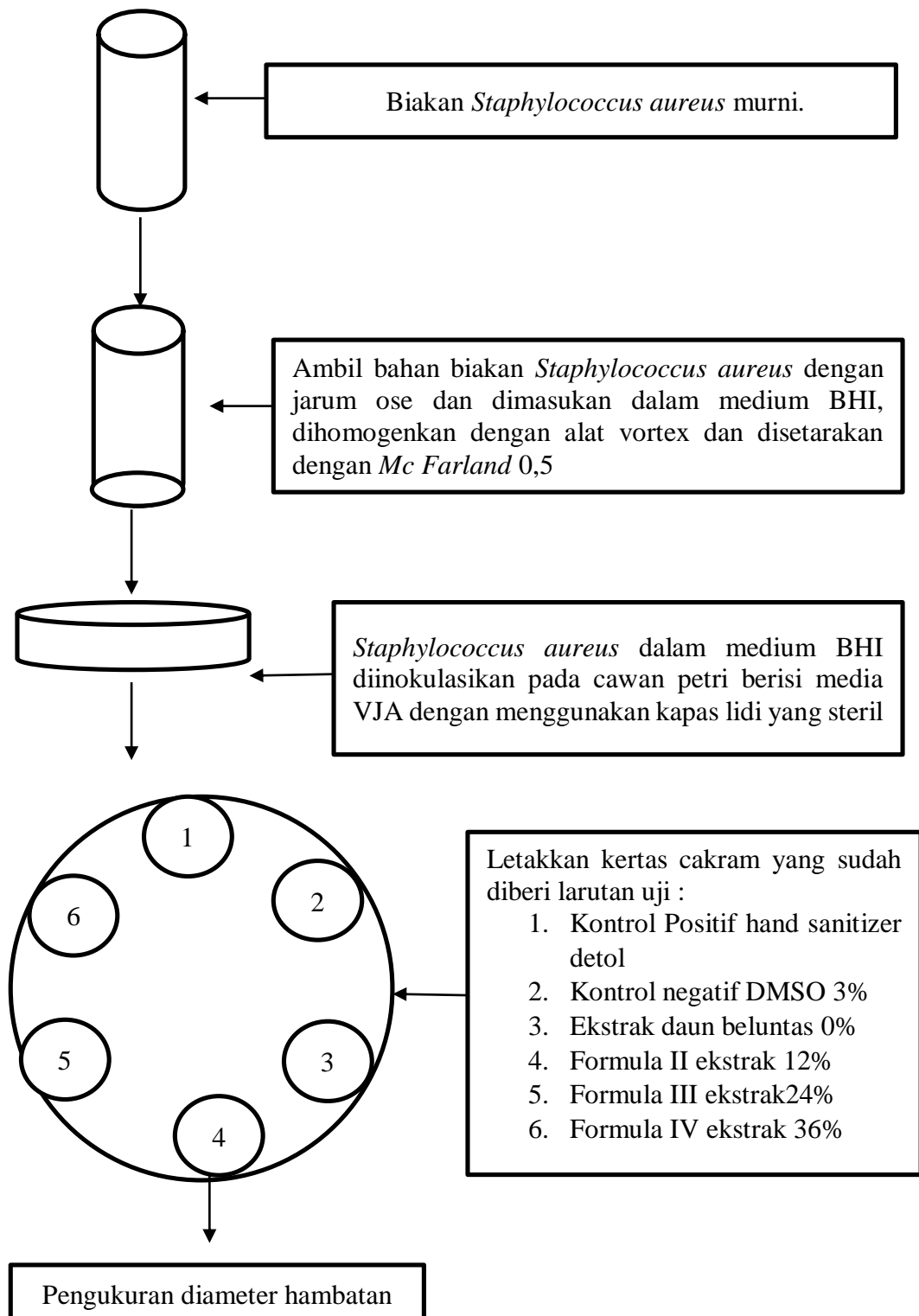
F. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Pembuatan Ekstrak



Gambar 4. Alur Pembuatan Formula



Gambar 5. Alur Pengujian Antibakteri