

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. 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 yang ingin diteliti, 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 Februari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun trembesi dalam formula gel.

Variabel utama penelitian ini adalah aktivitas antibakteri sediaan gel ekstrak etanol daun trembesi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Klasifikasi variabel utama

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

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 dengan berbagai konsentrasi dalam sediaan gel.

Variabel terkendali 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 terkendali dalam penelitian ini adalah ekstrak daun trembesi, kondisi laboratorium, alat dan bahan yang digunakan, 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 uji organoleptis, pengamatan pH, stabilitas fisik gel (homogenitas), viskositas, daya lekat dan adanya aktivitas antibakteri pada sediaan gel yang dihasilkan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun 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, daun trembesi diangin-anginkan hingga kering, tanpa terkena cahaya matahari secara langsung. Daun trembesi yang sudah kering 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 gel ekstrak etanol adalah gel 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.

Keenam, waktu penyembuhan pada kelinci yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* yang diolesi menggunakan sedian gel ekstrak etanol daun trembesi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah bejana maserasi dari bahan gelas, rotary evaporator, neraca analitik, filter kertas saring, cawan uap, gelas ukur, gelas

kimia, pipet ukur, erlemeyer, batang pengaduk, waterbath, cawan petri, cawan porselin, mortir, stamper, viscometer, tabung reaksi, mesh no 40, sendok tanduk, seperangkat alat uji daya sebar, pH meter, label, kertas aluminium foil, wadah gel, corong.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun trembesi yang masih segar tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, aquadest, etanol 96%, HPMC, metil paraben, propilen glikol, gentamisin.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tanaman

Identifikasi tanaman pada tahap ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun trembesi *Samanea saman* (Jacq.) Merr dengan mencocokkan ciri dan morfologi tanaman yang akan diteliti dengan kunci identifikasi untuk menghindari kesalahan dari tanaman yang digunakan untuk penelitian. Identifikasi tanaman trembesi dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu.

2. Pemilihan bahan

Daun trembesi yang diambil dari Desa Jati Grombok, Jambangan, Mondokan, Sragen, Jawa Tengah dilakukan penyortiran. Daun trembesi yang utuh, masih berwarna hijau dan tampak segar dipisahkan dari tangkainya. Daun yang sudah disortir dicuci dengan air mengalir hingga bersih, dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C dalam beberapa hari sampai kering.

3. Pembuatan serbuk

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

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun trembesi

Penetapan susut pengeringan serbuk daun trembesi dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi. Susut pengeringan menggunakan alat *moisture balance*. Alat yang akan digunakan ditara terlebih dahulu dengan akurasi dan temperatur sesuai dengan jumlah simplisia yang diujikan. Timbang kurang lebih 2 gram serbuk daun trembesi lalu dimasukan ke dalam alat tersebut

kemudian dicatat hasilnya berupa angka dalam persen yang terdapat pada layar *moisture balance*, untuk meminimalisir kesalahan penetapan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Syaratnya yaitu tidak lebih dari 10%. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang pada sat proses pengeringan (Depkes RI 2000).

5. Pembuatan ekstrak etanol daun trembesi

Serbuk sebanyak 500 gram dimasukan ke dalam botol maserasi dengan pelarut etanol 96% 10 bagian. Rendam 6 jam pertama dengan sesekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Hasil maserat kemudian dipisahkan dengan cara disaring menggunakan kain flannel. Ampas dari hasil penyaringan ditambah dengan pelarut yang sama sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pertama dan lakukan cara yang sama. Maserat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut dan diperoleh ekstrak daun trembesi. Ekstrak daun trembesi yang pelarutnya sudah diuapkan lalu dipekatkan di oven sampai didapatkan ekstrak yang kental (Depkes RI 2013).

6. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun trembesi

Penetapan susut pengeringan ekstrak etanol daun trembesi menggunakan alat *moisture balance*. Persyaratan yaitu kadar ekstrak etanol tidak lebih dari 10% (Ditjen POM 1979). Penetapan susut pengeringan ekstrak bertujuan untuk mengurangi kemungkinan kerusakan ekstrak yang disebabkan oleh pertumbuhan bakteri dan jamur.

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, steroid, triterpenoid, dan fenol yang terkandung dalam ekstrak etanol daun trembesi.

7.1 Identifikasi senyawa alkaloid. 2 gram ekstrak etanol daun trembesi ditambahkan larutan HCl 2N dan 9 ml aqudest kemudian dipanaskan selama 2 menit, didinginkan. Setelah itu ditambahkan larutan Mayer. Hasil positif

ditunjukan dengan adanya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning (Herny 2009)

7.2 Identifikasi senyawa flavonoid. 1 gram ekstrak kental daun trembesi dicampurkan dengan 100 ml air panas, kemudian ditambahkan 0,1 gram magnesium, setelah itu ditetesi dengan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Hasil positif dinyatakan apabila ekstrak berubah berwarna merah, kuning atau jingga (Depkes RI 1995)

7.3 Identifikasi golongan senyawa saponin. 5 ml Ekstrak kental daun trembesi dididihkan dalam penangas air selama 5 menit, setalah dingin kemudian disaring, filtrat dikocok kuat dengan arah vertikal selama 1-2 menit. Senyawa saponin dapat ditunjukan dengan adanya busa setinggi 1 cm yang stabil setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang. (Ditjen POM 2014)

7.4 Identifikasi golongan senyawa fenol. 5 ml Ekstrak etanol daun trembesi ditambahkan dengan FeCl₃. Timbulnya warna ungu kehitaman menandakan adanya senyawa golongan fenolik (Sinarsih 2016).

7.5 Identifikasi golongan senyawa terpenoid dan steroid. 5 ml ekstrak etanol daun trembesi ditambahkan pereaksi Liebermann Burcahrd. Terbentuknya warna merah menandakan positif terhadap adanya terpenoid dan terbentuknya warna biru atau hijau menandakan positif adanya steroid (Sinarsih 2016)

8. Formulasi Gel

Tabel 1. Formula Gel (Ardana 2015)

Bahan	F1 (Gram)	F2 (Gram)	F3 (Gram)
HPMC	3	5	7
Methyl Paraben	0,075	0,075	0,075
Propilen glikol	15	15	15
Propil paraben	0,025	0,025	0,025
Aquadest ad	150	150	150

Tabel 2. Rancangan formula yang telah dimodifikasi

Bahan	F1 Kontrol negatif (Gram)	F2 Kontrol positif (Gram)	F3 (Gram)	F4 (Gram)	F5 (Gram)
Ekstrak etanol daun trembesi	-	-	2	4	6
HPMC	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Methyl Paraben	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
Propilen glikol	10	10	10	10	10
Gentamisin	-	0,1	-	-	-
Aquadest ad	100	100	100	100	100

9. Pembuatan sediaan gel

HPMC yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam mortir panas yang sudah berisi aquadest panas, ditabur secara merata, dikembangkan kurang lebih 5 menit kemudian aduk sampai homogen. Selanjutnya ditambahkan propilen glikol yang sudah dicampur dengan metil paraben aduk sampai homogen kemudian ditambahkan ekstrak etanol daun trembesi dan aduk sampai homogen.

10. Pembuatan kontrol

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

10.2 Kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah gentamisin 0,1%, dengan cara formula gel ditambahkan gentamisin. Gentamisin dengan konsentrasi 0,1% disesuaikan dengan konsentrasi produk dipasaran yang telah ada.

11. Pengujian sifat fisik sediaan gel

11.1 Uji organoleptis. Uji Organoleptis dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan berupa pemeriksaan tekstur, warna, dan bau dari gel.

11.2 Uji homogenitas. Sedian gel yang akan di uji dioleskan pada sekeping kaca untuk diamati homogenitasnya. Sediaan yang homogen harus menunjukkan tidak terlihat adanya butiran kasar (Ardana dkk 2015).

11.3 Uji pH. Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter, dengan cara alat tersebut diikalibrasi dengan aquadest pH netral.

11.4 Uji Viskositas. Penetapan viskositas gel dilakukan dengan menggunakan viskometer. Rotor mulai berputar, jarum petunjuk viskositas akan bergerak secara otomatis menuju ke kanan. Baca viskositas yang telah stabil pada alat dengan satuan desi pascal second (*d-pass*). Pengukuran viskositas dimatikan kemudian pengujian dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk setiap gel yang diperiksa (Voight 1984).

11.5 Uji daya lekat. Gel diletakkan diatas objek yang telah ditentukan luasnya. Gelas objek yang lain diletakkan diatas gel tersebut dan ditekan dengan beban 1 kilogram selama 5 menit, kemudian gelas objek dipasangkan pada alat test, selanjutnya beban seberat 1 kilogram dilepaskan dan catat waktunya sehingga kedua gelas objek tersebut terlepas. Percobaan di replikasi sebanyak 3 kali untuk setiap sediaan gel yang diuji (Voight 1984).

11.6 Uji daya sebar. Pengujian daya sebar gel dilakukan dengan cara gel sebanyak 0,5 gram diletakkan di tengah alat (kaca bulat) kemudian ditutup oleh kaca bulat. Bagian atas kaca bulat ditambah beban 50 gram, 100 gram, dan 150 gram sebagai beban tambahan secara bertahap, setiap penambahan beban didiamkan selama 1 menit. Gel yang menyebar diukur diameternya (amati panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi). Cara tersebut diulangi untuk tiap formula gel yang diperiksa masing-masing 3 kali (Voigt 1984).

11.7 Uji stabilitas gel. Pengujian dilakukan dengan metode *freezethaw* 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, kemudian dilihat ada tidaknya pemisahan fase atau perubahan, uji pH dan uji viskositas gel (Priani *et al* 2014).

12. Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Pembuatan suspensi bakteri dengan mengambil biakan murni sebanyak 2 ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) 10 ml dan kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 setara dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Tujuan di sesuaikannya suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

dengan standar Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian.

13. Identifikasi Bakteri

13.1 Identifikasi bakteri menggunakan VJA. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan cara suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasi pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium telurit 1% dalam cawan petri dan di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan warna medium disekitar koloni kuning. Kemampuan *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi suasana asam dan indikator fenol red maka medium disekitar koloni berwarna kuning (Jawetz *et al* 2007).

13.2 Identifikasi morfologi secara pewarnaan Gram. Tujuan dari pewarnaan Gram untuk melihat apakah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 termasuk Gram positif atau Gram negatif. Pewarnaan Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 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 sarfanian 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 aquadestilat mengalir kemudian diteteskan 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 aquadestilat mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit, cuci dengan aquadestilat mengalir kemudian keringkan preparat. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop.

13.3 Identifikasi fisiologi secara biokimia. Identifikasi secara fisiologi ada dua cara yaitu katalase dan koagulase. Uji katalase dilakukan dengan suspensi bakteri yang telah dibuat pada media BHI sebanyak 5 ml yang ditambahkan H₂O₂

3% sebanyak 3 tetes. Hasilnya dikatakan positif dengan ditandai adanya gelembung udara sebab *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mempunyai enzim katalase. Penambahan H₂O₂ akan terurai menjadi 2H₂ dan O₂, hal ini menyebabkan timbulnya gelembung udara. Uji koagulase dilakukan dengan cara bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasi ke dalam BHI 10 ml kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Inokulum tersebut dipindahkan sejumlah 5 ml ke dalam tabung reaksi yang sudah disterilkan kemudian ditambahkan 0,5 ml 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 adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

14. Uji *in vivo* kelinci

Uji secara *in vivo* dilakukan pada lima kelinci. Kelinci yang digunakan adalah kelinci *New zealand* berkelamin jantan dengan berat 2 kg yang berusia 3 bulan. Kelinci diaklimatisasi dengan lingkungan tempat penelitian selama 5 hari sebelum diperlakukan dengan maksud hewan uji tersebut terbiasa dengan lingkungan dan perlakuan baru. Setelah diaklimatisasi bulu dibagian punggungnya dicukur dan pecukuran dibagi 5 lokasi. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinjeksikan secara subkutan sebanyak 0,2 ml ($0,3 \times 10^8$ cfu/0,2 ml) ke kelinci. Kelinci diamati setelah diinjeksi bakteri selama 48 jam untuk melihat adanya eritema, edema atau bahkan *pus* (nanah). Tanda-tanda kelinci sudah terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah timbulnya nanah. Bahan uji berupa gel diberikan setelah terbentuk nanah pada daerah infeksi dengan cara dioleskan dengan kapas lidi steril sebanyak 2x sehari. Pengamatan kesembuhan pada kelinci dilakukan dengan cara dilihat lamanya penyembuhan infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibagian kulit punggung kelinci selama kurang lebih 14 hari. Kesembuhan dinyatakan dengan hilangnya nanah, eritema dan luka pada kulit punggung kelinci.

Luas eritema dan edema dihitung dengan menggunakan penggaris. Skor yang digunakan yaitu :

1. Eritema
 - a. Tidak ada eritema = 0
 - b. Eritema sangat ringan = 1
 - c. Eritema ringan = 2
 - d. Eritema sedang = 3
 - e. Eritema berat = 4
2. Edema
 - a. Tidak ada edema = 0
 - b. Edema sangat ringan = 1
 - c. Edema ringan = 2
 - d. Edema sedang = 3
 - e. Edema berat = 4

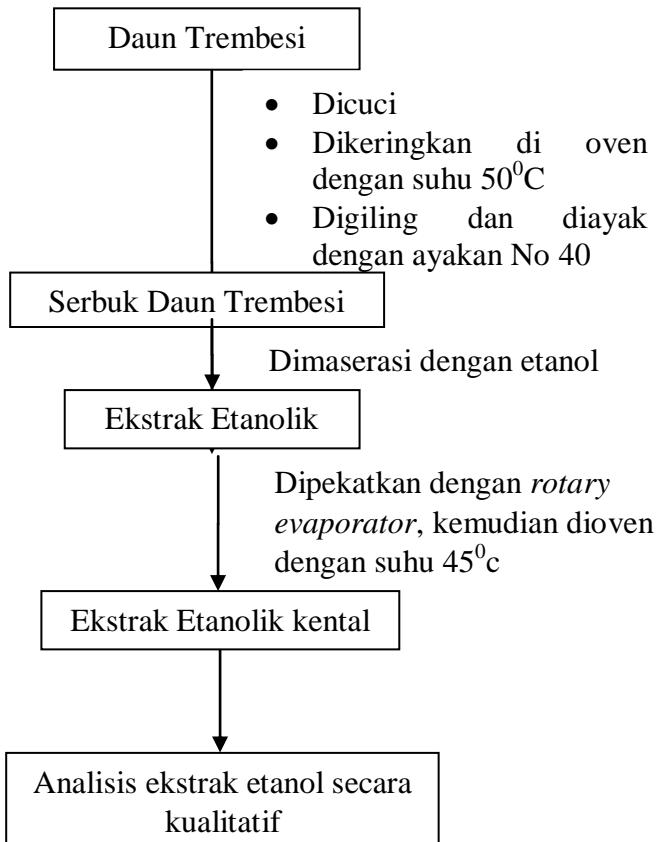
Indeks iritasi dihitung dengan cara menjumlahkan nilai dari setiap kelinci percobaan kemudian dibagi 4. Penilaian iritasinya sebagai berikut:

1. 0,00 = Tidak mengiritasi
2. 0,04 - 0,99 = Sedikit mengiritasi
3. 1,00 - 2,99 = Iritasi ringan
4. 3,00 - 5,99 = Iritasi sedang
5. 6,00 - 8,00 = Iritasi berat.

E. Analisis Data

Data penelitian yang didapat berupa, uji pH, uji viskositas, uji daya lekat, uji daya sebar dan data kuantitatif penyembuhan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 berupa data eritema dan edema, dan lamanya penyembuhan. Data hasil penelitian tersebut dianalisa dengan menggunakan One Sample *Kolmogorov-Smirnov* dan *Two Way Anova* dengan program SPSS for window.

F. Skema penelitian

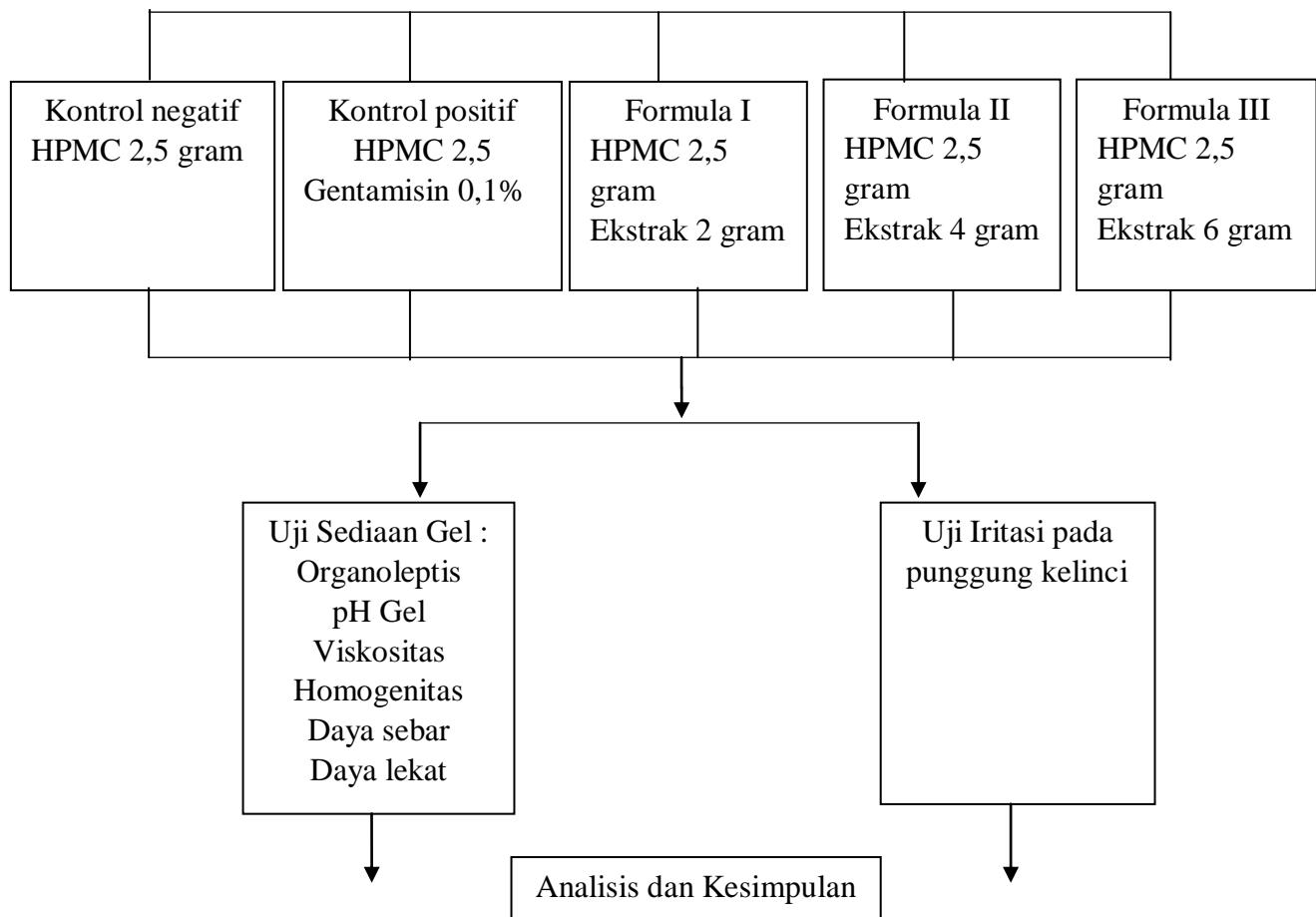


Gambar 6. Ekstraksi daun trembesi (*Samanea saman* (Jacq.)Merr)

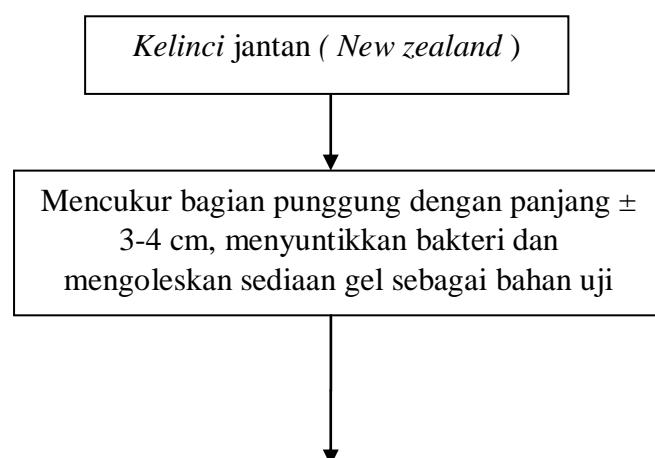
HPMC yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam mortir panas yang sudah berisi aquadest panas, ditabur secara merata, dikembangkan kurang lebih 5 menit kemudian aduk sampai homogen.

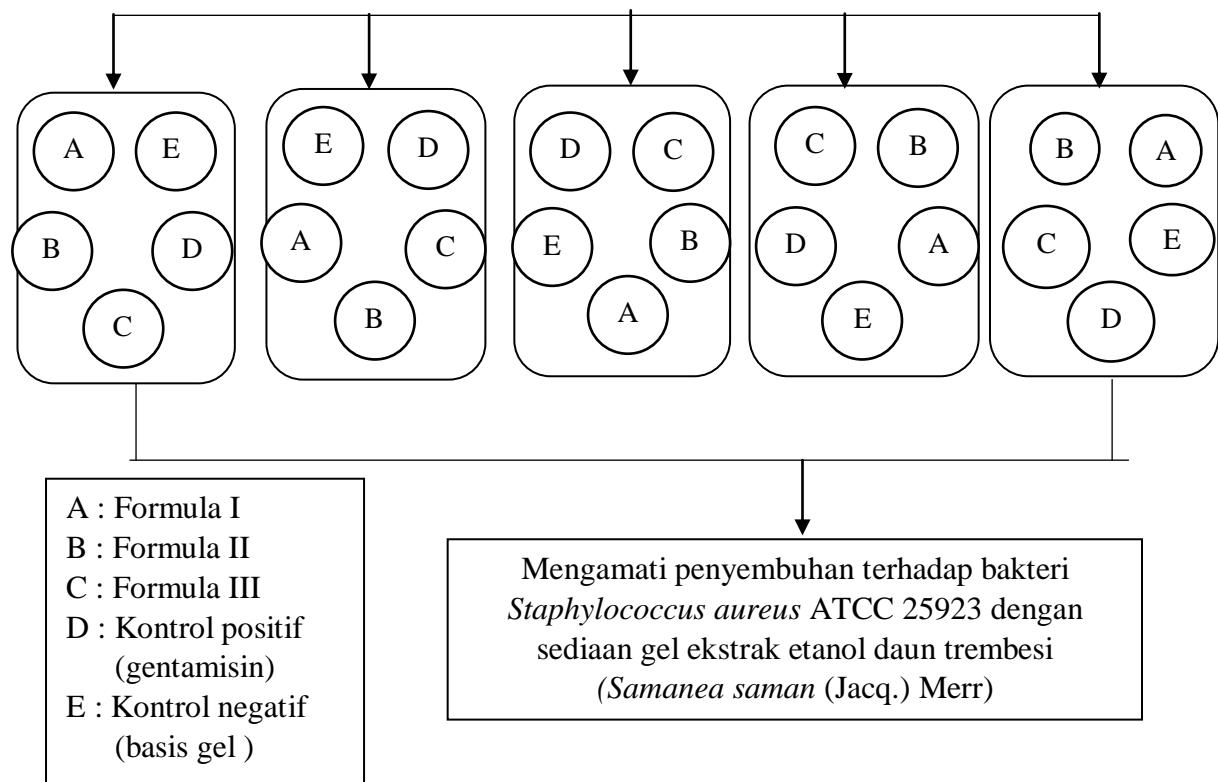
Selanjutnya ditambahkan propilen glikol yang sudah dicampur dengan metil paraben aduk sampai homogen.

Menambahkan ekstrak etanol daun trembesi pada formulasi I,II,III dan menambahkan gentamisin pada kontrol positif. kemudian diaduk hingga homogen



Gambar 7. Skema pembuatan gel ekstrak etanol daun trembesi (*Samanea saman* (Jacq) Merr)





Gambar 8. Pengujian aktivitas gel ekstrak etanol daun trembesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr secara *in vivo*