

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah jumlah dari keseluruhan objek yang akan diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun katuk (*Sauropus androgynus* (L). Merr.) yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populasi yang hendak diamati dan dianggap bisa mewakili keseluruhan dari populasi. Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun katuk (*Sauropus androgynus* (L). Merr.) segar yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda setra terbebas dari hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L). Merr.) yang diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklarifikasi kedalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah basis salep daun katuk (*Sauropus androgynus* (L). Merr.) dengan berbagai variasi konsentrasi basis.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas penyembuhan jerawat pada kulit kelinci yang dilihat dari hilangnya eritema dan nanah.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah proses pembuatan ekstrak kental, peralatan yang digunakan, galur, lingkungan tempat tinggal, laboratorium, dan *Staphylococcus epidermidis*.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun katuk adalah daun yang diperoleh dari tanaman katuk yang berasal dari Tawangmangu, Karaganyar, Jawa Tengah, pada bulan Januari 2019.

Kedua, serbuk daun katuk adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan, dan pengayakan daun katuk.

Ketiga, ekstrak etanol daun katuk adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Keempat, sediaan salep adalah sediaan semi padat yang dibuat dengan mencampurkan ekstrak daun katuk dalam berbagai jenis basis salep.

Kelima, hewan uji yang digunakan adalah kelinci jantan putih (*New Zealand White*) berumur \pm 3-5 bulan, berat kelinci 3-5 kg dan kulit kelinci yang digunakan adalah pada bagian punggung kelinci yang telah dicukur.

Keenam, bakteri hewan uji pada penelitian ini adalah bakteri gram positif *Staphylococcus epidermidis* yang diperoleh dari Laboratorium Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

Ketujuh, pengujian aktivitas antibakteri adalah menggunakan punggung kelinci yang telah dicukur dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus epidermidis* secara subkutan per 0,2 ml pada 5 lokasi (b, c, d, e, dan f) lalu ditutup dengan perban steril dibiarkan selama 24-48 jam sampai terjadi jerawat. Tahap selanjutnya setelah jerawat terbentuk, pada daerah a tidak diberi perlakuan apapun hanya dicukur bulu punggungnya saja (kontrol normal), daerah b diolesi dengan kontrol negatif yaitu hanya berisi basis salep saja, daerah c diolesi dengan kontrol positif yaitu salep gentamisin 0,1%, pada daerah d diolesi formula 1 (berisi salep ekstrak daun katuk 20 g, PEG 400 24 g, PEG 4000 56 g), daerah e diolesi formula 2 (berisi salep ekstrak daun katuk 20 g, PEG 400 40 g, PEG 4000 40 g), daerah f diolesi formula 3 (berisi salep ekstrak daun katuk 20 g, PEG 400 56 g, PEG 4000 24 g). Lalu kulit punggung kelinci tersebut dibalut dengan perban steril untuk mencegah kontaminasi. Pengolesan salep dilakukan 2 kali sehari (pagi dan sore) selama 7 hari hingga jerawat sembuh yang ditandai dengan hilangnya jerawat dan nanah.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan antara lain neraca analitik, oven, blender, ayakan no. 40, botol maserasi, tabung reaksi, pipet tetes, pipet volum, corong pisah, gelas ukur, jangka sorong, beaker glass, cawan porselin, batang pengaduk, sendok, mortir dan stamper, erlenmeyer, corong, timbangan gram, logam, alat pencukur bulu, isolasi tebal, gunting, jarum suntik, deglas, kaca obyek, sudip, inkubator, *vacuum rotary evaporator*, viskometer, pH meter, alat uji daya sebar, dan alat uji daya lekat, alat *moisture balance*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun katuk yang masih segar dan belum berubah warna, yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci yang telah dikondisikan selama satu minggu yang kemudian dengan sengaja diinfeksi bakteri agar timbul jerawat. Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Kemudian bahan lain yang digunakan adalah etanol 70%, PEG 400, PEG 4000, aquadest, serbuk magnesium, FeCl, H₂SO₄, asam asetat, HCl, larutan pereaksi *dragendorf, mayer*.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun katuk (*Sauvagesia androgynus* (L). Merr.) yang berkaitan dengan ciri – ciri mikroskopis dan makroskopis, serta mencocokan ciri – ciri morfologis yang ada pada tanaman daun katuk (*Sauvagesia androgynus* (L). Merr.) terhadap kepustakaan yang dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah.

2. Pengambilan dan pemilihan bahan

Daun katuk (*Sauvagesia androgynus* (L). Merr.) yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak adalah daun yang tidak terlalu tua dan juga tidak terlalu muda.

Daun digunakan dalam keadaan segar untuk menghasilkan ekstrak yang lebih maksimal.

3. Pengeringan simplisia

Daun katuk disortir dan dicuci dengan menggunakan air mengalir agar kotoran yang menempel pada daun katuk menghilang. Kemudian daun katuk yang telah bersih dioven pada temperatur 50°C sampai kering.

4. Pembuatan serbuk

Simplisia yang sudah dikeringkan kemudian diserbuk dengan alat penyerbuk (blender), diblender sampai halus kemudian diayak dengan mess no. 40 dan disimpan dalam wadah yang kering kemudian ditutup rapat.

5. Penetapan kadar lembab serbuk daun katuk dan ekstrak kental daun katuk

Penetapan kadar lembab serbuk daun katuk dan ekstrak kental daun katuk dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Sebelumnya alat yang akan digunakan ditara terlebih dahulu dengan akurasi dan temperatur sesuai dengan jumlah bahan yang diujikan. Bahan ditimbang sebanyak 2 gram lalu dimasukan ke dalam alat tersebut kemudian dicatat hasilnya berupa angka dalam persen yang terdapat pada layar *moisture balance*. Penetapan kadar air dilakukan sebanyak tiga kali untuk meminimalisir kesalahan. Syarat kadar lembab yaitu tidak lebih dari 10% (BPOM RI 2004).

6. Pembuatan ekstrak kental daun katuk

Ekstraksi dilakukan dengan menimbang serbuk daun katuk sebanyak 500 gram lalu dimasukkan dalam botol coklat kemudian ditambah dengan pelarut etanol 70% sebanyak 5625 ml dan didiamkan selama 5 hari dengan sesekali dikocok. Setelah 5 hari sampel yang direndam tersebut disaring menggunakan kain flannel menghasilkan filtrat 1 dan 1 residu 1. Residu yang ada kemudian ditambah etanol 70% sebanyak 1875 ml dan dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali dikocok. Setelah 2 hari sampel tersebut disaring menggunakan kain flannel menghasilkan filtrat 2 dan residu 2. Filtrat 1 dan 2 dicampur menjadi satu lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak kental daun katuk. Ekstrak ditimbang dan disimpan dalam wadah gelas tertutup sebelum digunakan untuk pengujian.

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun katuk

Identifikasi kandungan kimia yang dimaksud adalah untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak daun katuk. Identifikasi yang dilakukan berupa identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin yang terkandung dalam ekstrak daun katuk.

7.1 Identifikasi senyawa alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan cara diambil 0,5 g ekstrak ditambahkan 5 ml HCl 1% lalu dimaserasi selama 2 jam dan disaring. Kemudian sebanyak 1 ml filtrat ditambahkan 1-2 tetes pereaksi dragendorf. Sampel dinyatakan positif apabila berwarna jingga (Kursia *et al.* 2016).

7.2 Identifikasi senyawa flavonoid. Uji flavonoid dilakukan dengan cara ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan serbuk Mg, 1 ml HCl : etanol (10:10) dan amil alkohol secukupnya, hingga membentuk 2 lapisan. Apabila lapisan atas berwarna kuning, jingga atau merah, maka dinyatakan positif mengandung flavonoid (Sanjayasari & Pliliang 2011)

7.3 Identifikasi senyawa saponin. Uji saponin dilakukan dengan 0,5 gram ekstrak ditambah dengan 0,5 ml air panas, dikocok selama 1 menit. Larutan diamati apabila menimbulkan busa, maka ditambahkan HCl 1% dan ditunggu selama 10 menit, apabila busa tetap ada maka ekstrak positif mengandung saponin (Kartina *et al.* 2013).

7.4 Identifikasi senyawa tannin. Uji tanin dilakukan dengan 0,5 gram ekstrak ditambah dengan 1-2 ml air dan 2 tetes FeCl 1%. Larutan ekstrak diamati apabila menghasilkan warna hijau kebiruan, maka ekstrak positif mengandung tannin (Lathifah 2008).

8. Pembuatan sediaan salep

Tabel 1. Formula Salep Ekstrak Daun Katuk

Bahan	Formulasi Salep Ekstrak Daun Katuk		
	F I	F II	F III
Ekstrak	20	20	20
PEG 400	24	40	56
PEG 4000	56	40	24
Salep	100	100	100

Cara pembuatan:

PEG 4000 dilelehkan bersamaan dengan PEG 400, kemudian diaduk hingga homogen. Basis salep dicampur dengan ekstrak daun katuk dalam mortir salep kemudian diletakkan dalam pot salep.

9. Pengujian sifat fisik sediaan salep ekstrak daun katuk

9.1 Uji organoleptik. Diamati bentuk, warna, homogenitas dan bau dari salep ekstrak daun katuk.

9.2 Uji Homogenitas. Sediaan salep pada bagian atas, tengah, dan bawah diambil kemudian diletakkan pada plat kaca lalu digosok dan diraba (Naibaho *et al.* 2013).

9.3 Uji pH. Salep yang sudah ditimbang sebesar 0,5 g dilarutkan dengan 5 ml aquades, kemudian di cek pH larutannya (Naibaho *et al.* 2013).

9.4 Uji viskositas. Pengujian viskositas ini menggunakan alat viskometer dengan rotor yang sesuai. Rotor ditempatkan di tengah pot salep yang berisi salep, kemudian alat dihidupkan agar rotor mulai berputar. Jarum menunjukkan viskositas secara otomatis akan bergerak ke kanan. Setelah stabil, kemudian dibaca viskositas pada skala yang ada pada viskometer tersebut.

9.5 Uji daya sebar. Salep yang sudah ditimbang sebesar 0,5 g diletakkan di atas kaca bulat yang berdiameter 15 cm, lalu kaca lainnya diletakkan di atasnya dan dibiarkan selama 1 menit. Diameter penyebaran salep diukur. Setelahnya, ditambahkan 100 g beban tambahan dan didiamkan selama 1 menit lalu diukur diameter yang konstan (Naibaho *et al.* 2013).

9.6 Uji daya lekat. Salep ditimbang 0,25 g diletakkan di atas gelas obyek yang telah ditentukan luasnya, lalu diletakkan gelas obyek yang lain di atas salep tersebut dan ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Selanjutnya dipasang gelas obyek pada alat tes. Dilepas beban seberat 80 g, dan dicatat waktunya hingga kedua gelas obyek tersebut terlepas (Naibaho *et al.* 2013).

9.7 Uji daya proteksi. Diambil kertas saring (10x10 cm). Dibasahi dengan larutan fenolftalein untuk indikator. Setelah itu kertas dikeringkan. Olesi kertas tersebut dengan salep yang akan dicoba (satu muka) seperti lazimnya orang menggunakan salep. Kemudian pada kertas saring lainnya, dibuat suatu area

(2,5x2,5 cm) dengan parafin padat yang dilelehkan. Setelah kering/dingin akan didapatkan area yang dibatasi dengan parafin padat, kemudian kertas tersebut ditempelkan diatas kertas sebelumnya dan diteteskan dengan larutan KOH 0,1 N. Kertas sebelumnya dibasai dengan larutan fenolftalein dilihat pada waktu 15 detik, 30 detik, 45 detik, 60 detik, 3 menit, dan 5 menit. Jika tidak ada noda merah berarti salep memiliki kemampuan proteksi (Dhego *et al.* 2017).

10. Pembuatan kontrol

10.1 Kontrol normal. Kontrol normal pada penelitian ini tidak diberikan perlakuan apapun.

10.2 Kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah salep gentamisin 0,1%.

10.3 Kontrol negatif. Kontrol negatif pada penelitian ini adalah salep yang berisi basis saja tanpa ekstrak.

11. Proses peremajaan bakteri uji

Bakteri uji ditumbuhkan pada media *Nutrien Agar* (NA) dengan cara menggoreskan bakteri dari biakan murni menggunakan jarum ose pada permukaan agak miring. Bakteri yang telah digoreskan pada media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Aziz 2010).

12. Pembuatan suspensi larutan uji

Hasil peremajaan bakteri *Staphylococcus epidermidis* disuspensikan dengan larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%), yang setara dengan *Mc. Farland* 0,5 (10^8 koloni/mL) (Kursia *et al.* 2016).

13. Identifikasi bakteri uji

Identifikasi umum dilakukan dengan pewarnaan gram dengan cara bakteri uji difiksasi dan diwarnai dengan kristal violet dan didiamkan selama 5 menit. Zat warna dibuang dan diganti dengan larutan *lugol's iodine* (larutan I + KI) dibiarkan selama 45-60 detik. Larutan *lugol's iodine* dibuang dan sediaan dicuci dengan alkohol 96% selama 30 detik atau digoyang-goyangkan sampai tidak ada zat warna yang mengalir lagi. Sediaan dicuci dengan air dan diwarnai dengan air fukhsin selama 1-2 menit. Sediaan dicuci, dikeringkan dan diperiksa di bawah mikroskop.

Bakteri gram positif akan tampak berwarna ungu dan bakteri gram negatif berwarna merah (Wahdaningsih *et al.* 2014).

14. Penyiapan hewan uji

Hewan uji kelinci jantan putih sebanyak 5 ekor dengan umur 3-5 bulan dengan berat $\pm 3-5$ kg. Kelinci diaklimatisasi dengan lingkungan tempat penelitian selama 5 hari dengan maksud agar hewan uji tersebut terbiasa dengan lingkungan dan perlakuan yang baru. Hewan uji di tempatkan dalam kandang dan diberi makan dan minum yang cukup untuk setiap harinya.

15. Pengujian efek antibakteri

Lima ekor kelinci yang telah diaklimatisasi selama 5 hari, kemudian masing-masing dicukur bulu pada bagian punggungnya di 6 lokasi (a, b, c, d, e, f) yang berbeda dengan luas area 9 cm^2 yang dicukur di masing-masing lokasi dengan jarak ± 3 cm. Kulit kelinci pada 1 lokasi (a) sebagai kontrol normal, dibiarkan saja dan tidak diberikan perlakuan apa pun sedangkan pada 5 lokasi (b, c, d, e, f) diinfeksi 0,2 ml suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* secara sub kutan dan diamati selama 24-48 jam untuk melihat terjadinya jerawat. Selanjutnya setelah jerawat terbentuk, daerah b diolesi dengan kontrol negatif yaitu hanya berisi basis salep saja, daerah c diolesi dengan kontrol positif yaitu salep gentamisin 0,1%, pada daerah d diolesi formula 1 (berisi salep ekstrak daun katuk 20 g, PEG 400 24 g, PEG 4000 56 g), daerah e diolesi formula 2 (berisi salep ekstrak daun katuk 20 g, PEG 400 40 g, PEG 4000 40 g), daerah f diolesi formula 3 (berisi salep ekstrak daun katuk 20 g, PEG 400 56 g, PEG 4000 24 g). Lalu kulit punggung kelinci tersebut dibalut dengan perban steril untuk mencegah kontaminasi. Pengolesan salep dilakukan 2 kali sehari (pagi dan sore). Mengamati efek anti jerawat berdasarkan hilangnya eritema dan nanah (Naibaho *et al.* 2013).

16. Pengamatan pengujian efek antibakteri

Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan cara mengamati lamanya penyembuhan infeksi *Staphylococcus epidermidis* yang diinfeksi pada kulit punggung kelinci setelah pemberian salep, kemudian dianalisa di

Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Parameter yang diamati adalah lamanya penyembuhan yang dinyatakan dengan hilangnya lesi dan jerawat.

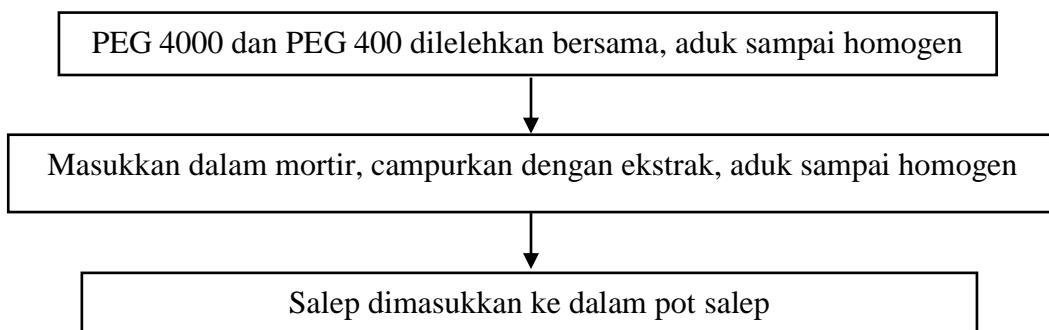
E. Analisis Hasil

Data penelitian yang didapat berupa viskositas, pemerikasaan pH, daya sebar, daya lekat, dan uji antibakteri. Data hasil penelitian tersebut dianalisa dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov* dan *Two Way Anova* dengan program SPSS *for windows*.

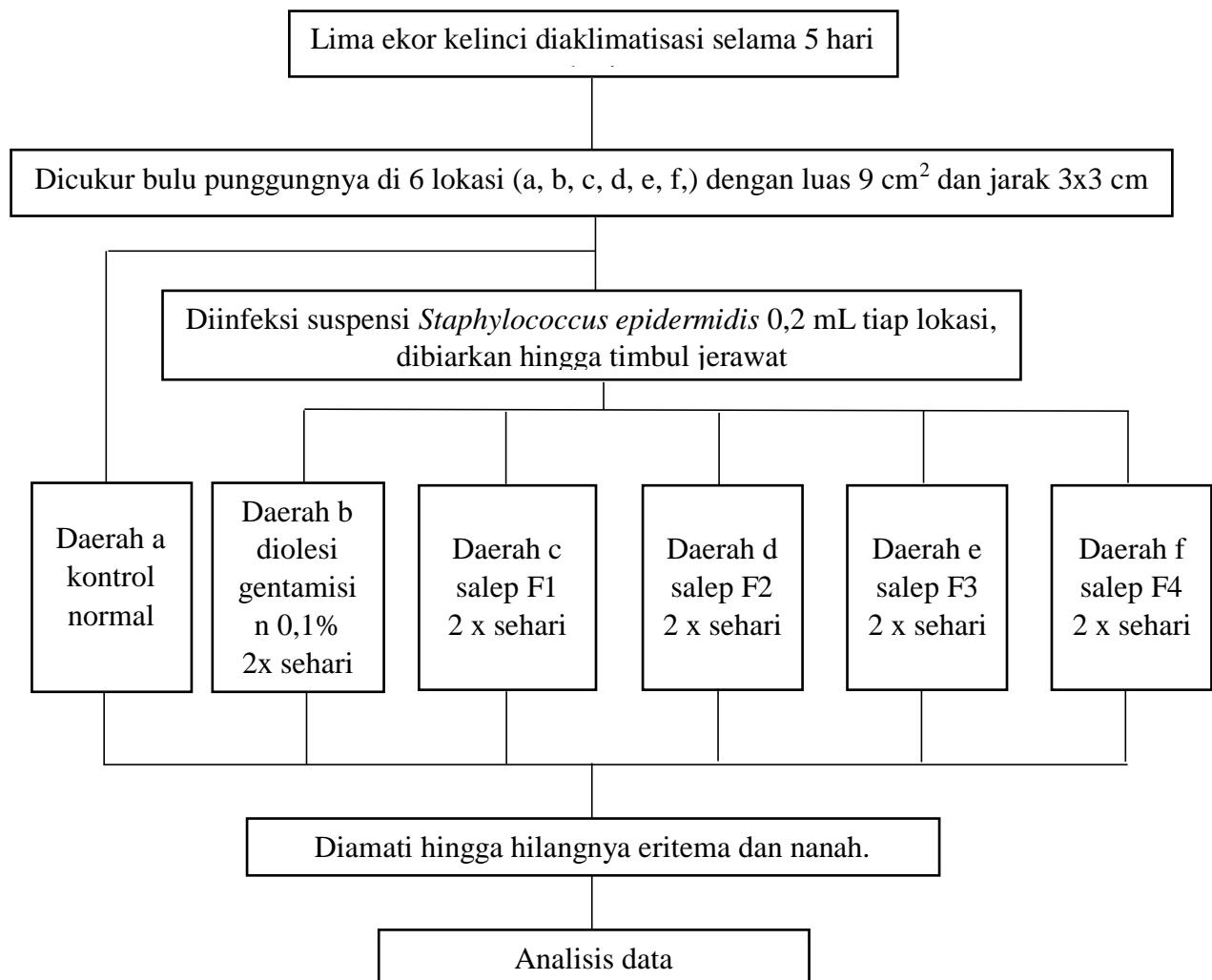
F. Skema Penelitian



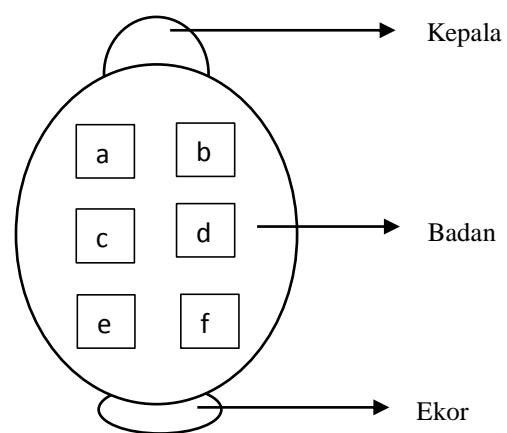
Gambar 1. Ekstraksi daun katuk



Gambar 2. Formula salep



Gambar 3. Skema pengujian efek antibakteri



Gambar 4. Lokasi bagian punggung kelinci yang diberi perlakuan