

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah suatu keseluruhan terdiri dari subjek dan objek dengan karakter dan kualitas yang dipilih peneliti kemudian disimpulkan (Sugiyono, 2017). Pada penelitian ini populasi yang digunakan adalah daun kersen yang diperoleh di daerah Kecamatan Kademangan, Probolinggo, Jawa Timur.

Sampel adalah bagian dari populasi yang digunakan dalam suatu penelitian. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 5% diformulasikan menjadi sediaan masker gel *peel-off*.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah sediaan masker gel *peel-off* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan variasi konsentrasi HPMC.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri sediaan masker gel *peel-off* dari ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 5% terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dikategorikan ke dalam beberapa macam diantaranya variabel bebas, terikat, dan tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang dapat mempengaruhi perubahan variabel terikat (Sugiyono, 2017). Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi HPMC pada masker gel *peel-off* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.).

Variabel terikat adalah variabel yang dapat dikendalikan dan mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu

formulasi gel *peel-off*, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan metode penelitian.

Variabel tergantung adalah variabel yang menjadi utama permasalahan dalam suatu penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah mutu fisik, stabilitas formula dan aktivitas antibakteri dari sediaan masker gel *peel-off* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, pengambilan secara acak sampel daun kersen (*Muntingia calabura* L.) harus terbebas dari hama serta masih segar dan berwarna cerah. Tanaman ini diambil dari daerah Kecamatan Kademangan, Probolinggo, Jawa Timur.

Kedua, daun kersen adalah ekstrak hasil (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 5% menggunakan metode maserasi.

Ketiga, formula sediaan adalah sediaan masker gel *peel-off* yang dibuat dari ekstrak daun kersen dengan variasi konsentrasi HPMC.

Keempat, mutu fisik masker gel *peel-off* ekstrak daun kersen yang meliputi uji organoleptis, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, waktu mengering dan stabilitas.

Kelima, bakteri uji pada penelitian yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi di Universitas Setia Budi.

Keenam, Pengujian aktivitas antibakteri masker gel *peel-off* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah dengan menggunakan metode difusi sumuran.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Sampel pada penelitian ini yang digunakan adalah daun kersen (*Muntingia calabura* L.).

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini antara lain etanol 96%, Hidroksipropil metilselulosa (HPMC), Polivinil alkohol (PVA),

propilen glikol, metil paraben, aqua, kristal violet, lugol iodin, safranin, eritromisin, serbuk Magnesium, Hcl pekat, Hcl 2%, reagen Dragendorff, reagen mayer, Hcl 2N, mannitol, H₂O₂ 3% dan standar Mc Farland 0,5 .

1.3 Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

1.4 Medium. Media bakteri pada penelitian yang digunakan antara lain *Nutrient Agar* (NA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mannitol Salt Agar* (MSA), dan *Mueller Hinton Agar* (MHA).

2. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, alat maserasi, gelas ukur, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, ayakan nomor 40, mesin giling, mortar dan stamper, mikroskop, inkubator, autoclave, *rotary evaporator*, *hot plate*, jarum ose, cawan petri, jangka sorong, pH meter, viskometer dan magnetik stirrer, piknometer, bunsen, *stopwatch*, mikropipet, dan laptop.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Pada penelitian ini tahapan pertama dengan mendeterminasi tanaman. Proses determinasi bertujuan untuk memastikan kebenaran dari tanaman uji yaitu kersen (*Muntingia calabura* L.). Morfologi tanaman juga diperhatikan ciri-cirinya terhadap pustaka serta dibuktikan di Universitas Setia Budi.

2. Pengambilan bahan

Tanaman pada penelitian ini adalah daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang diperoleh secara acak dari daerah Kecamatan Kademangan, Probolinggo, Jawa Timur. Parameter pemilihan daun kersen yaitu daun yang sudah tua, tidak berwarna kuning dan memiliki kualitas baik.

3. Pembuatan serbuk daun kersen

Daun kersen yang sudah diperoleh disortasi yang bertujuan agar menghilangkan agar kotoran dan kontaminan yang melekat. Tahapan pengeringan

dilakukan dengan metode menjemur daun di bawah sinar matahari agar. Tujuan proses pengeringan untuk mengurangi kandungan air dan aktivitas enzimatis pada daun yang dapat menurunkan mutu dari simplisia. Daun kersen yang telah kering digiling dengan alat penggiling untuk menghaluskan kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40.

4. Identifikasi serbuk daun kersen

4.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis pada serbuk meliputi bentuk, warna, bau dan rasa menggunakan panca indera.

4.2 Pemeriksaan kadar air. Kadar air pada ekstrak diuji menggunakan metode destilasi toluene. Menimbang sebanyak 10 gram serbuk daun kersen dan masukkan ke dalam labu alas bulat. Menambahkan toluen sebanyak 200 ml yang telah dijenuhkan dan pasang rangkaian alat. Proses penyulingan dilakukan pada suhu ruang. Volume air dibaca setelah tidak terjadi penambahan volume air dalam dan dihitung dalam satuan % (Saifudin *et al.*, 2011).

4.3 Pemeriksaan susut pengeringan. Pengujian susut pengeringan pada serbuk daun kersen menggunakan alat *Moisture balance*. Menimbang seksama 2 gram serbuk simplisia, letakkan pada wadah yang sudah ditara. Operasikan alat pada suhu 105°C dengan waktu tertentu. Nilai susut pengeringan tertera pada alat yang dinyatakan dalam satuan persen. Hasil susut pengeringan dikatakan baik jika kadar airnya tidak melebihi 10% (Depkes RI, 2001).

5. Pembuatan ekstrak daun kersen

Proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan serbuk halus daun kersen. Ekstraksi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10. Menimbang 600 gram serbuk daun kersen dan tambahkan 6000 ml etanol 96%, masukkan ke dalam botol maserasi. Lakukan penyimpanan selama 3 hari disertai penggojokkan. Saring filtrat daun kersen dengan kertas kain flannel kemudian kertas saring. Filtrat yang telah dihasilkan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 45°C. Maserasi dilakukan hingga memperoleh maserat jernih, kemudian menimbang hasil perolehan ekstrak kental (Mulangsari dan Puspitasari, 2018).

6. Penetapan persentase rendemen

Penetapan persentase rendemen yaitu persentase bobot dengan cara menimbang antara rendemen dan bobot serbuk simplisia. Persyaratan hasil rendemen harus sesuai dengan masing-masing monografi ekstrak (Depkes RI, 2017).

7. Identifikasi ekstrak daun kersen

7.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis pada ekstrak meliputi bentuk, warna, bau dan rasa menggunakan panca indera.

7.2 Pemeriksaan kadar air. Menimbang dan masukan 10 gram ekstrak ke dalam wadah yang telah ditara. Pengeringan kadar air menggunakan oven suhu 105°C. Dilakukan penimbangan setiap 1 jam sekali sampai perbedaan penimbangan berturut-turut tidak melebihi 0,25% (Depkes RI, 2000).

7.3 Pemeriksaan bebas alkohol. Pengujian bebas alkohol bertujuan untuk memastikan ekstrak daun kersen tidak mengandung alkohol. Pengujian ini dilakukan dengan memasukkan sebanyak 2 tetes ekstrak dalam tabung reaksi dan menambahkan sebanyak 3 tetes H₂SO₄ pekat dan asam asetat (CH₃COOH). Larutan dipanaskan dan diamati perubahan bau yang timbul. Ekstrak mengandung alkohol jika terdapat bau ester (Kurniawati, 2017).

7.4 Pemeriksaan fitokimia ekstrak daun kersen

7.3.1. Flavonoid. Masukkan ekstrak daun kersen sebanyak 5 ml ditambahkan serbuk Magnesium sebanyak 0,05 gram dan Hcl pekat 1 ml. Campuran tersebut dikocok kuat, hasil mengandung flavonoid ditandai terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Depkes RI, 1995).

7.3.2. Tanin. Masukkan 1 ml sampel ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan FeCl₃ 1% sebanyak 3 tetes. Hasil positif mengandung tanin saat terbentuk warna hijau violet atau kehitaman (Depkes RI, 1995).

7.3.3. Saponin. Masukkan sebanyak 5 ml ekstrak ke dalam tabung reaksi lalu tambahkan 2 tetes Hcl 2N. Ekstrak dikatakan positif mengandung saponin jika terbentuk busa selama 7 menit (Depkes RI, 1995).

7.3.4. Triterpenoid. Sampel ekstrak dilarutkan dengan kloroform, asam anhidrat sebanyak 0,5 ml dan H₂SO₄ pekat sebanyak 2 ml. Ekstrak positif

mengandung terpenoid jika pada batas larutan membentuk cincin kecoklatan (Padmasari *et al.*, 2013).

8. Formula masker gel *peel-off* ekstrak daun kersen

Sediaan masker gel *peel-off* dirancang dengan variasi konsentrasi HPMC pada setiap formula.

Tabel 1. Formula Masker Gel Peel-Off (Tanjung dan Rokaeti, 2020)

Bahan	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Ekstrak kulit buah naga	0,1	0,1	0,1
PVA	6	10	14
HPMC	1	1	1
Gliserin	10	10	10
Metil paraben	0,2	0,2	0,2
Propil paraben	0,05	0,05	0,05
Aqua ad	100 ml	100 ml	100 ml

Tabel 2. Rancangan Formula Masker Gel *Peel-off* Ekstrak Daun Kersen

Bahan	F1(%)	F2(%)	F3(%)	F4(%)
Ekstrak daun kersen	5	5	5	5
HPMC	1,5	2	2,5	3
PVA	10	10	10	10
Propilen glikol	10	10	10	10
Metil paraben	0,1	0,1	0,1	0,1
Aqua ad	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

Keterangan :

Formula 1 : Masker gel *peel-off* dengan konsentrasi HPMC 1,5%

Formula 2 : Masker gel *peel-off* dengan konsentrasi HPMC 2%

Formula 3 : Masker gel *peel-off* dengan konsentrasi HPMC 2,5%

Formula 4 : Masker gel *peel-off* dengan konsentrasi HPMC 3%

9. Pembuatan masker gel *peel-off*

Formula masker gel *peel-off* pada penelitian ini terdapat 4 variasi konsentrasi HPMC 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan. Mengkalibrasi botol 100 ml selanjutnya menimbang bahan sesuai perhitungan. Melarutkan ekstrak daun kersen dengan aquades sedikit demi sedikit hingga larut. Kembangkan hidroksipropil metilselulosa (HPMC) dalam aquades panas aduk dengan konstan. Polivinil alkohol (PVA) dikembangkan dalam aquades panas aduk hingga mengembang, setelah mengembang masukkan pada *beaker glass* berisi HPMC. Melarutkan metil paraben ke dalam propilen glikol kemudian campur dengan ketiga bahan tersebut dan aduk hingga homogen. Sisa aquades kemudian ditambahkan dan diaduk kembali sampai homogen.

10. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

10.1 Identifikasi bakteri makroskopis. Identifikasi dilakukan dengan metode cawan gores yaitu inokulasi suspensi bakteri pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA). Biakan bakteri secara aseptis diambil dengan ose digores pada media, kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. *Staphylococcus aureus* mampu memfermentasikan manitol dan fenol *acid* membentuk suasana asam sehingga di sekitar media membentuk koloni berwarna kuning (Krishna, 2013).

10.2 Identifikasi bakteri secara pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram pada bakteri dilakukan dengan cara membuat preparat ulas yang telah terfiksasi. Tahapan identifikasi tiap tahap preparat ditetesi pewarna kristal violet, lugol iodine dan safranin. Setiap pemberian warna diamkan selama 1 menit dan lunturkan dengan air mengalir. Preparat dikeringkan dengan kertas tisu yang ditempelkan pada sisi ulasan. Amati preparat dengan mikroskop (Volk & Wheller, 1988). Hasil pengujian dikatakan positif *Staphylococcus aureus* jika terbentuk warna ungu seperti anggur pada sel bakteri.

10.3 Identifikasi secara biokimia. Identifikasi bakteri secara biokimia terdapat dua cara yaitu uji katalase dan koagulase. Suspensi bakteri diuji katalase menggunakan larutan dapar fosfat ditambahkan dengan H₂O₂ 3%. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* bersifat katalase positif sehingga terdapat gelembung oksigen karena adanya pemecahan H₂O₂ (Jawetz *et al.*, 2013). Pengujian koagulase dilakukan dengan plasma darah manusia atau hewan. Larutan BHI dengan plasma ditambahkan biakan bakteri *Staphylococcus aureus*. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian amati adanya gumpalan. Pengujian dikatakan positif ditunjukkan saat tabung uji di balik endapan plasma tidak terlepas dan tetap menempel pada dinding tabung (Jawetz *et al.*, 2001).

11. Pembuatan kontrol

Pembuatan kontrol pada uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* terdiri dari kontrol positif dan negatif. Pada penelitian ini kontrol negatif yang digunakan adalah masker gel *peel-off* yang tidak mengandung ekstrak daun kersen. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah masker gel *peel-off* dengan ciprofloxacin.

12. Pengujian mutu fisik sediaan masker gel *peel-off*

12.1 Pengujian organoleptis. Pengujian organoleptis bertujuan untuk melihat mutu fisik sediaan menggunakan alat indera. Parameter uji organoleptis yaitu konsistensi sediaan, warna, dan bau (Cahyani *et al.*, 2017).

12.2 Pengujian homogenitas. Pengujian homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan meletakkan sejumlah sediaan pada *obyek glass* dengan menempelkan pada *obyek glass* lainnya. Hasil dikatakan homogen jika tidak terdapat partikel atau gumpalan yang terlihat (Saputra *et al.*, 2019).

12.3 Pengujian pH. Pengujian pH bertujuan untuk menyesuaikan antara pH sediaan dan kulit dengan melihat derajat keasaman sediaan agar tidak mengiritasi kulit. Tahapan pengujian menggunakan pH meter dengan cara mengkalibrasi dengan larutan buffer pH 4 dan 7. Masker gel *peel-off* diuji dengan cara memasukkan ke dalam wadah, lalu diukur pHnya dengan pH meter (Saputra *et al.*, 2019). Nilai pH untuk produk topical menurut SNI 16-4399-1996 yaitu dalam rentang 4,5- 6,5.

12.4 Pengujian viskositas. Pengujian viskositas sediaan gel diuji menggunakan alat *Viscotester* Rion seri VT-04F rotor No. 2 pada suhu ruang (Suryani *et al.*, 2017). Nilai viskositas ditentukan dengan mengamati jarum yang menunjuk pada angka dari skala pada rotor dengan satuan dPa.s. Nilai pada satuan *viskotester* yaitu dPa.s dikonversi kedalam satuan cPs. syarat nilai viskositas gel yaitu 3000-50.000 cPs tujuannya agar memudahkan dalam pengaplikasian pada kulit (Wati dan Yuniarto, 2018).

12.5 Pengujian daya sebar. Pengujian daya sebar masker gel *peel-off* dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,5 gram pada kaca berdiameter 15 cm. Pada sampel meletakkan kaca yang sudah ditara kemudian mengukur diameter penyebaran sediaan dengan menghitung rata-rata dari beberapa sisi. Penambahan beban dilakukan sampai 150 gram selama 1 menit (Sunnah *et al.*, 2019). Hasil pengujian daya sebar yang baik dalam rentang 5-7 cm (Zubaydah, 2020).

12.6 Pengujian daya lekat. Pengujian daya lekat pada bertujuan untuk mengetahui kemampuan melakat zat aktif pada formula setelah dioleskan pada kulit. Tahapan uji dilakukan dengan menimbang 0,5 gram sediaan yang diletakkan

diatas *object glass*. Meletakkan beban sebesar 1 kg selama 5 menit dan dipasang pada alat uji. Melepaskan beban 1 kg dan catat waktu hingga kedua *object glass* terpisah (Saputra *et al.*, 2019). Nilai uji daya lekat sediaan masker gel yang baik yaitu lebih dari 4 detik (Septiani *et al.*, 2011).

12.7 Pengujian waktu kering. Pengujian waktu mengering bertujuan untuk mengetahui kemampuan sediaan dapat mengering membentuk lapisan film. Sebanyak 1 gram diletakkan pada *object glass* dan hitung kecepatan mengering menggunakan *stopwatch*. Waktu mengering masker gel *peel-off* yang ideal memiliki nilai dalam rentang 15-30 menit (Saputra *et al.*, 2019).

12.8 Pengujian stabilitas. Pengujian stabilitas dengan metode *cycling test* dilakukan pada suhu yang berbeda selama enam siklus. Dalam satu siklus sediaan masker gel *peel-off* disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam kemudian dipindahkan ke dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Amati sediaan terkait perubahan warna, tekstur, dan aroma (Depkes RI, 1995).

13. Pengujian aktivitas antibakteri masker gel *peel-off*

13.1 Pembuatan media uji. Pembuatan MHA (Media *Mueller* digunakan sebagai media untuk pengujian antibakteri pada penelitian ini. Menimbang MHA sebanyak 3,8 gram dilarutkan dengan menggunakan aquades 100 mL ke dalam tabung, kemudian diletakkan diatas *hotplate* autoklaf dengan suhu 121°C (Handayani *et al.*, 2016).

13.2 Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus*. Peremajaan bakteri uji menggunakan metode gores dengan media NA (*Nutrient Agar*). Proses peremajaan dilakukan secara aseptis dengan mengambil sebanyak satu ose bakteri murni kemudian diinokulasikan kedalam tabung berisi media NA (Ngajow *et al.*, 2013)

13.3 Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*. Pembuatan suspensi bertujuan untuk menentukan jumlah bakteri dan membandingkan dengan larutan standart Mc. Farland 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Pembuatan suspensi metode difusi menggunakan biakan bakteri murni sebanyak 2 ose kedalam tabung berisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) sebanyak 5 ml kemudian sesuaikan kekeruhannya dengan larutan standar Mc Farland 0,5.

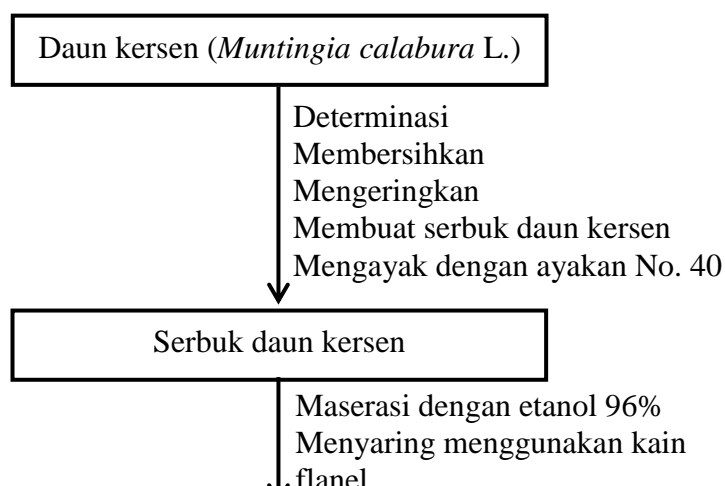
13.4 Pengujian Antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi sumuran. Tahapan dilakukan dengan cara menginokulasi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah distandarkan menggunakan kapas lidi steril pada cawan berisi media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan diamkan selama 5 menit tujuannya agar bakteri tersuspensi. Membuat enam sumuran menggunakan alat *boorprop* pada media MHA yang telah digores bakteri uji. Masing-masing sumuran diisi dengan menimbang sebanyak 0,1 gram formula 1, formula 2, formula 3, formula 4, kontrol positif dan kontrol negatif. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 18 hingga 24 jam. Aktivitas antibakteri ditandai dengan adanya daerah jernih di sekitar sumuran dan ukur masing-masing diameter jernihnya.

E. Analisis hasil

Hasil pengujian masker gel *peel-off* ekstrak daun kersen yaitu mutu fisik, stabilitas, dan diameter hambat antibakteri dianalisis secara statistik dengan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Analisa data yang diperoleh menggunakan uji *Shapiro wilk*. Jika hasil analisa ($p > 0,05$), maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan data terdistribusi normal. Analisa dilanjutkan dengan *one way ANOVA* (*Analysis Of Variant*). Jika hasil analisa ($p < 0,05$) diartikan data tidak terdistribusi normal maka analisa dilanjutkan dengan uji *Kruskall-wallis* kemudian uji *Wilcoxon*. Pengujian stabilitas pada sediaan dilakukan dengan masing-masing formula menggunakan uji *Paired t-test* (Dewi *et al.*, 2021).

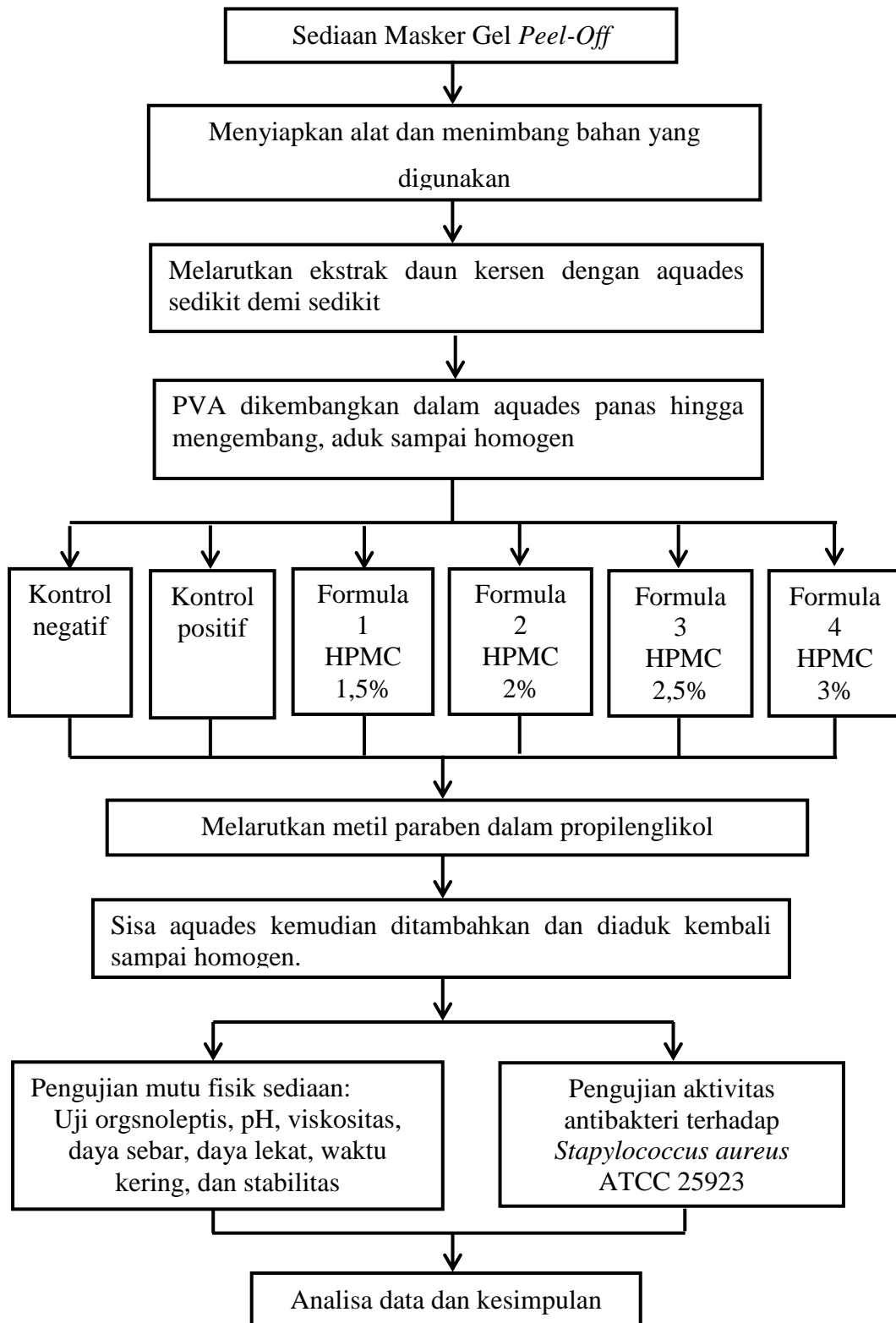
F. Skema jalannya penelitian

1. Skema ekstraksi daun kersen



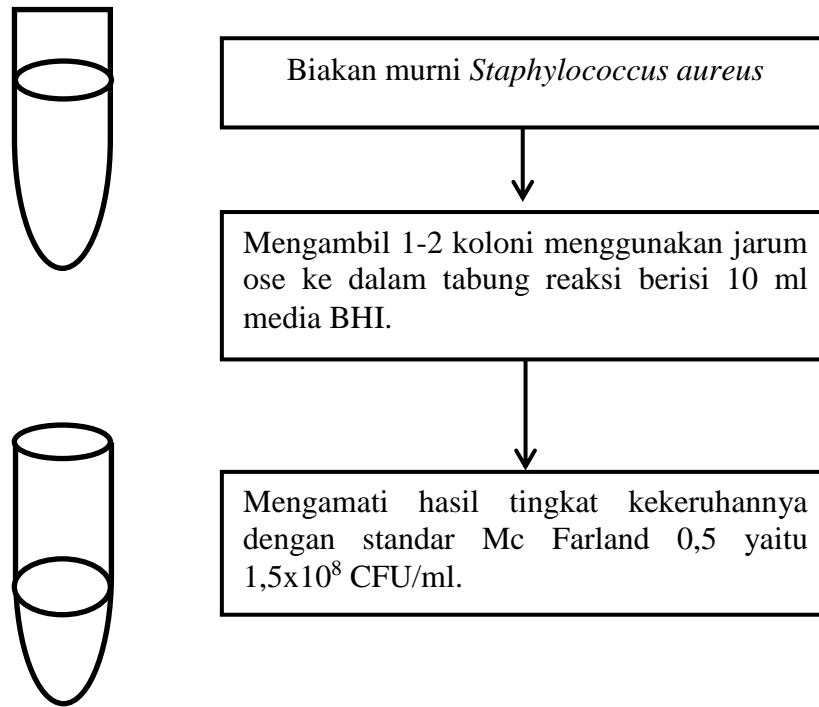
Gambar 8. Skema pembuatan ekstrak daun kersen

2. Skema pembuatan masker gel peel-off ekstrak daun kersen



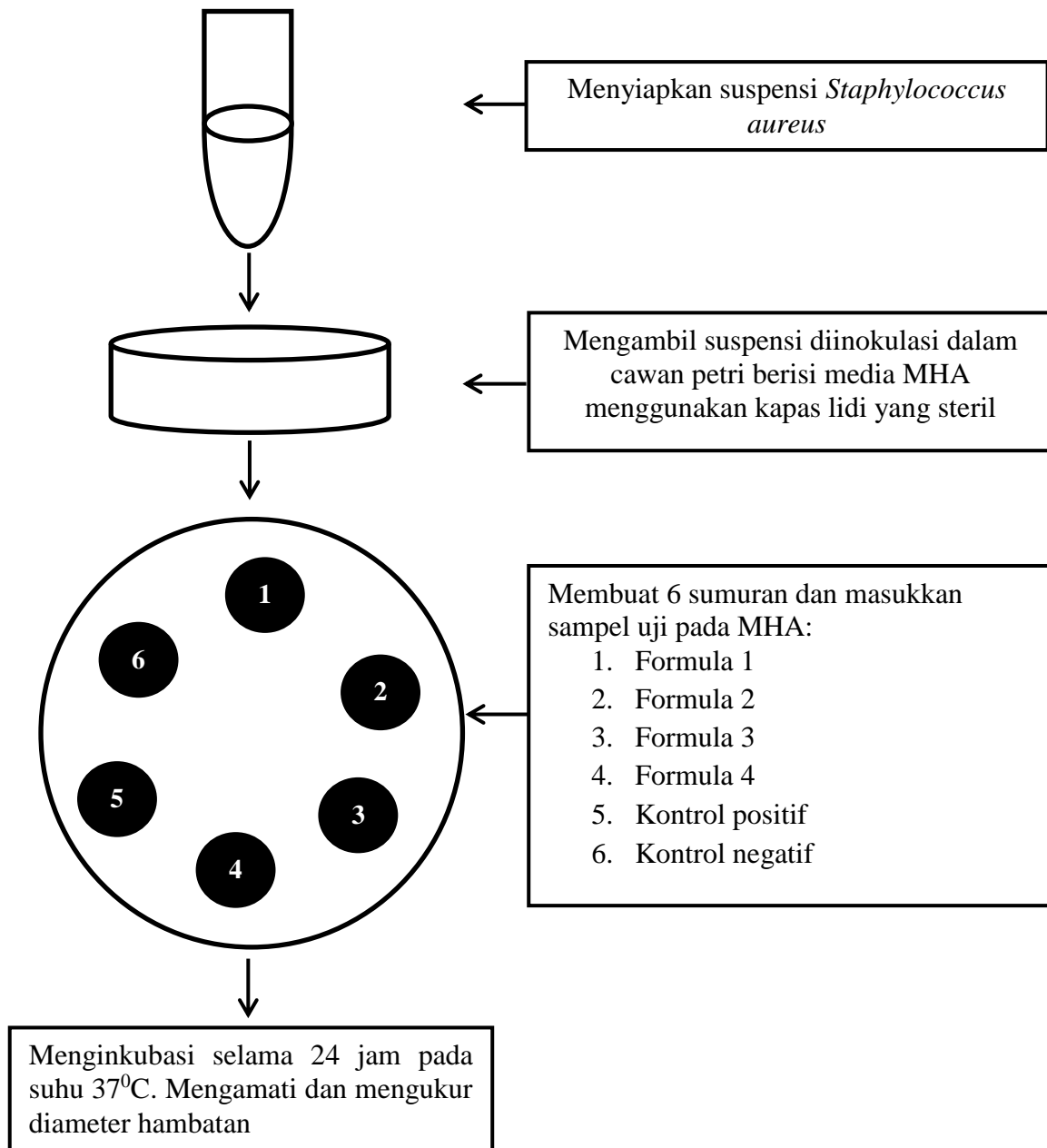
Gambar 9. Skema pembuatan masker gel *peel-off* ekstrak daun kersen

3. Skema pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*



Gambar 10. Skema pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

4. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran



Gambar 11. Skema pengujian aktivitas antibakteri