

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian kuantitatif dengan menggunakan model desain penelitian deskriptif eksperimental. Penelitian deskriptif dilakukan dengan skrining fitokimia dan penelitian eksperimental meliputi pembuatan simplisia dan ekstrak etanol bunga kecombrang dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, formulasi krim, evaluasi fisik dan uji aktivitas antibakteri sediaan krim terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan metode difusi sumuran untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan adanya zona hambat, dilanjutkan dengan analisis data menggunakan uji *One Way ANOVA*, dengan hasil data disajikan dalam tabel dan gambar.

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

##### **1. Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah krim ekstrak etanol bunga kecombrang dengan konsentrasi ekstrak F1 = 5%; F2 = 10%; dan F3 = 15%.

##### **2. Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah evaluasi fisik sediaan krim dan uji aktivitas antibakteri krim ekstrak etanol bunga kecombrang terhadap *Propionibacterium acne*.

##### **3. Variabel Kontrol**

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah metode pembuatan krim, alat uji fisik sediaan krim, sterilisasi alat dan ruang kerja, kontaminasi mikroorganisme lain, suhu dan waktu inkubasi, volume media, ukuran lubang sumuran, volume suspensi bakteri dan volume antibakteri yang diinokulasikan ke dalam lubang sumuran.

### C. Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3.1 Definisi Operasional**

| Variabel  | Pengertian   | Cara Ukur  | Alat Ukur   | Skala  | Hasil   |
|---|--|--|---|--|---|
| Ekstrak etanol bunga kecombrang ( <i>Etlintera elatior</i> (Jack) R.M.Sm.)                    | Sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstrak bahan aktif dari simplisia nabati menggunakan pelarut yang sesuai kemudian diuapkan (Depkes RI, 2020). | Rendemen   | Neraca analitik   | Rasio  | %   |
| Skrining fitokimia ekstrak etanol bunga kecombrang ( <i>Etlintera elatior</i> (Jack) R.M.Sm.) | Cara yang dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder suatu bahan alam (Julianto, 2019).                                     | Penambahan larutan pereaksi  | Indra manusia   | Warna  | +/-   |
| Krim ekstrak etanol bunga kecombrang ( <i>Etlintera elatior</i> (Jack) R.M.Sm.)               | Sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai (Depkes RI, 2020).                | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Uji Organoleptis</li> <li>2. Uji Homogenitas</li> <li>3. Uji pH</li> <li>4. Uji Daya Sebar</li> <li>5. Uji Daya Lekat</li> <li>6. Uji Tipe Krim</li> <li>7. Uji Stabilitas Krim</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Indra manusia</li> <li>2. Kaca transparan</li> <li>3. pH universal</li> <li>4. Kaca transparan &amp; anak timbang</li> <li>5. Plat kaca</li> <li>6. Aquades</li> <li>7. Sentrifugasi</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bentuk, warna, bau</li> <li>2. Ada tidaknya pertikel</li> <li>3. pH 1-7</li> <li>4. Rasio</li> <li>5. Rasio</li> <li>6. Terlarut atau tidak</li> <li>7. Ada tidaknya pemisahan fase</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Semi padat, merah tua, aromatika</li> <li>2. Homogen</li> <li>3. 4,5-6,5</li> <li>4. cm</li> <li>5. Detik</li> <li>6. M/A</li> <li>7. Stabil</li> </ol> |

| Aktivitas antibakteri | Kemampuan zat uji yaitu ekstrak etanol bunga kecombrang dalam menghambat <i>Propionibacterium acne</i> di dalam cawan petri menggunakan metode sumuran (Setiawan, 2021). | Diameter zona hambat di sekeliling lubang. | Jangka sorong | Rasio | mm |
|-----------------------|--|--|---------------|-------|----|
|-----------------------|--|--|---------------|-------|----|

---

#### **D. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### 1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai dengan bulan Mei 2023.

##### 2. Tempat Penelitian

Determinasi tanaman bunga kecombrang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto. Proses pembuatan ekstrak dan skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Farmakognosi STIKes Ibnu Sina Ajibarang. Proses pembuatan sediaan krim dan evaluasi fisik sediaan krim dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi STIKes Ibnu Sina Ajibarang. Penelitian uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi STIKes Ibnu Sina Ajibarang.

#### **E. Populasi dan Sampel**

##### 1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga dari tanaman kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.Sm.) dan bakteri penyebab jerawat.

## 2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.Sm.) yang diperoleh dari perkebunan warga di Desa Pernasidi, Kecamatan Cilongok, Kabupaten Banyumas dan biakan murni *Propionibacterium acnes* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi STIKes Ibnu Sina Ajibarang.

## F. Instrumen Penelitian

### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (*Matrix*), loyang aluminium, oven, blender (*Philips*), toples kaca, *rotary evaporator*, ayakan, pH meter, erlenmeyer (*HERMA*<sup>®</sup>), *waterbath* (*Faithful*), autoklaf (GEA Medika), inkubator (B-ONE), batang pengaduk, mortar stamper, corong (*HERMA*<sup>®</sup>), cawan porselen, cawan petri (*HERMA*<sup>®</sup>), kawat ose, pipet volume, jangka sorong (*Taffware*), *Laminar Air Flow* (*Messgerate*), *beakerglass* (*Pyrex*<sup>®</sup>), *magnetic stirrer*, *Spektrofotometri UV-Vis* (D-LAB), *hockey stick*, *corck borner*, mikropipet (*Accumax Pro*), tabung reaksi (*Pyrex*<sup>®</sup>), objek glass (*Sail Brand*), kapas steril, kertas saring, gelas ukur (*HERMA*<sup>®</sup>), aluminium foil, penjepit kayu, plat kaca, bunsen, anak timbang.

### 2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith), etanol 70%, aquadest, antibiotik klindamisin (*Medi-Klin*<sup>®</sup>), asam stearat, cera alba, vaselin alba, TEA, Propilen Glikol, asam klorida 2N, logam Mg, larutan FeCl 1%, asam asetat, asam sulfat pekat, NaCl fisiologis, biakan murni *Propionibacterium acne* dan media *Nutrient Agar* (NA).

## G. Prosedur Penelitian

### 1. Pengumpulan dan Determinasi Bunga Kecombrang

Bunga kecombrang diambil untuk penelitian ini dari perkebunan warga di Desa Pernasidi, Kec.Cilongok, Kab. Banyumas. Determinasi bunga kecombrang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto.

### 2. Pembuatan Simplisia Bunga Kecombrang

Pembuatan simplisia bunga kecombrang dilakukan di Laboratorium Farmakognosi STIKes Ibnu Sina Ajibarang. Bunga kecombrang yang digunakan sebanyak 5,5 kg, kemudian disortasi basah, dibersihkan dengan air mengalir, ditiriskan, diiris tipis, dan dikeringkan selama tiga hari dalam lemari pengering pada suhu 50°C. Setelah kering sampel dibuat serbuk dan diayak menggunakan ayakan mesh 40, kemudian ditimbang berat keringnya (Setyaningsih *et al.*, 2022).

Perhitungan susut pengeringan dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{berat simplisia kering}}{\text{berat simplisia basah}} \times 100\%$$

### 3. Pembuatan Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang

Ekstrak etanol bunga kecombrang dibuat dengan metode maserasi, yaitu simplisia bunga kecombrang sebanyak 500 gram direndam dalam 3800 ml pelarut etanol 70%, sampel ditutup dan disimpan pada tempat terlindung dari cahaya selama 3 hari sambil diaduk (3 kali sehari). Kemudian kertas saring Whatman digunakan untuk penyaringan sampai diperoleh maserat. Ampasnya diremaserasi dengan 1200 ml pelarut etanol 70% selama 2 hari kemudian disaring. Seluruh maserat digabung dan dipisahkan dengan *rotary evaporator* kemudian diuapkan diatas *waterbath* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental (Iqbal, 2021).

Rumus perhitungan rendemen ekstrak sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{berat bahan yang diekstrak}} \times 100\%$$

#### 4. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang

##### a. Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 2 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah dengan 0,5 ml HCl pekat dan 3-4 pita logam Mg. Adanya flavonoid ditandai dengan warna merah, oranye atau hijau (Endarini, 2016).

##### b. Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 2 ml ekstrak cair tanaman ditambahkan ke dalam 2 ml air suling. Selanjutnya, ditetesi dengan 1-2 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Adanya tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau gelap atau hijau kebiruan (Endarini, 2016).

##### c. Pemeriksaan Saponin

Sebuah tabung reaksi yang berisi 0,5 gram ekstrak diisi dengan 10 ml air panas, didinginkan, dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik hingga terbentuk busa berukuran 1-10 cm. Busa ini stabil selama minimal 10 menit dan tidak hilang ketika 1 tetes asam klorida 2N ditambahkan, menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 2017).

##### d. Pemeriksaan Terpenoid

Sebanyak 2 ml ekstrak cair dilarutkan dengan 2 ml kloroform, kemudian ditambahkan asam asetat 0,5 ml dan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya kandungan terpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin coklat atau violet pada perbatasan larutan (Nasution, 2020).

##### e. Pemeriksaan Minyak atsiri

Sebanyak 0,5 gram ekstrak diencerkan dengan 1 ml aquadest kemudian dipanaskan di *magnetic stirrer* di atas gelas arloji hingga diperoleh residu. Hasil positif minyak atsiri ditandai dengan bau khas yang dihasilkan oleh residu ekstrak tersebut (Ciulei, 1984).

## 5. Formulasi Krim Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang

**Tabel 3.2 Formulasi Krim Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang**

| Bahan         | Kegunaan     | Formula Krim (gram) |       |       |       |
|---------------|--------------|---------------------|-------|-------|-------|
|               |              | F0                  | F1    | F2    | F3    |
| Ekstrak       | Zat aktif    | 0                   | 2,5   | 5     | 7,5   |
| Asam stearate | Pengemulsi   | 7,5                 | 7,5   | 7,5   | 7,5   |
| Cera alba     | Pengental    | 1                   | 1     | 1     | 1     |
| Vaselin alba  | Emolient     | 4                   | 4     | 4     | 4     |
| TEA           | Pengemulsi   | 0,75                | 0,75  | 0,75  | 0,75  |
| PPG           | Humektan     | 4                   | 4     | 4     | 4     |
| Nipagin       | Preservative | 0,1                 | 0,1   | 0,1   | 0,1   |
| Aquadest      | Basis air    | ad 50               | ad 50 | ad 50 | ad 50 |

Keterangan :

F0 = Formulasi basis krim sebagai kontrol negatif

F1 = Formulasi 1 dengan konsentrasi ekstrak 2,5 gram

F2 = Formulasi 2 dengan konsentrasi ekstrak 5 gram

F3 = Formulasi 3 dengan konsentrasi ekstrak 7,5 gram

**Tabel 3.3 Kontrol Positif Krim Klindamisin**

| Kategori  | Keterangan                   |
|-----------|------------------------------|
| Merek     | Medi-Klin® 15 gram           |
| Kandungan | <i>Clindamycin phosphate</i> |
| Indikasi  | <i>Acne vulgaris</i>         |

## 6. Pembuatan Krim Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang

Asam stearate, cera alba, dan vaselin alba dilebur di atas penangas air pada suhu 70°C. TEA dan propilenglikol dilarutkan dalam air suhu 70°C. Selanjutnya tambahkan campuran TEA dan propilenglikol ke dalam cera, asam stearat dan vaselin yang telah dileburkan lalu aduk dalam mortar hangat sampai homogeny (Anief, 2019). Saat krim sudah dingin, tambahkan ekstrak etanol bunga kecombrang dan aduk sekali lagi hingga terbentuk massa yang kental dan homogen. Krim harus ditempatkan dalam wadah yang tertutup rapat.

## 7. Evaluasi Krim Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang

### a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan menggunakan panca indra dengan cara mengamati perubahan bentuk, warna dan aroma dari sediaan krim (Ansel, 2011).

### b. Uji Homogenitas

Mengambil krim dari setiap formula secukupnya dan dioleskan di atas plat kaca, diraba dan saat digosokkan massa krim harus menunjukkan susunan homogen yaitu tidak terasa adanya bahan padat di kaca (Voight, 1995).

### c. Uji pH

Ditimbang sebanyak 1 gram krim dan dilarutkan dengan 10 ml aquadest, lalu dicelupkan kertas pH universal ke dalam larutan tersebut. pH sediaan krim yang baik sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5-6,5 (Tranggono *and* Latifa, 2007).

### d. Uji Daya Sebar

Ditimbang 0,5 gram diletakkan di tengah plat kaca dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian diberikan beban tambahan sebesar 50 gram sampai 250 gram setiap 1 menit lalu diameter sebarnya diukur untuk melihat pengaruh beban terhadap perubahan diameter sebar. 5-7 cm merupakan daya sebar yang baik untuk sediaan topikal (Wasitaatmadja, 2012).

### e. Uji Daya Lekat

Ditimbang 0,5 gram krim diletakkan pada plat kaca. Kedua plat kaca ditempelkan sampai plat tersebut menyatu, diberikan beban 250 gram selama 5 menit, kemudian dilepas dengan diberi beban pelepasan. Periode waktu hingga pemisahan kedua lempeng dicatat. Daya lekat krim yang baik yaitu lebih dari 4 detik (Wasitaatmadja, 2012).

f. Uji Tipe Krim

Uji tipe krim ini menggunakan metode pengenceran. Ditimbang 0,5 gram krim lalu diencerkan dengan 10 ml aquadest dengan cara dikocok atau diaduk, kemudian diamati kelarutannya. Krim tipe M/A dapat diencerkan dengan pelarut air sedangkan krim tipe A/M tidak dapat diencerkan dengan pelarut air (Fatmawaty *et al.*, 2015).

g. Uji Stabilitas Krim (*Centrifugal test*)

Ditimbang 5 gram masing-masing formulasi krim, dimasukkan ke dalam tabung centrifuge, kemudian diputar dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit dan dievaluasi bentuk fisik krim. Pemisahan fase adalah karakteristik krim yang tidak stabil (Elya *et al.*, 2013).

8. Pengujian Aktivitas Antibakteri Krim Bunga Kecombrang

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Media tanam bakteri dan peralatan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan cara dibakar dengan nyala api bunsen (Yusmaniar *et al.*, 2017).

b. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA ditimbang sebanyak 6 gram dilarutkan dengan 300 ml aquadest dalam erlenmeyer kemudian panaskan dengan *magnetic stirrer* sampai mendidih dan homogen. Selanjutnya media tersebut disterilkan menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atm. Tuang media ke dalam cawan petri yang telah disterilkan sekitar 25 ml dan tabung reaksi sekitar 10ml, dibiarkan hingga memadat. (Putri, 2022).

c. Peremajaan Bakteri *Propionibacterium acnes*

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara mengambil satu ose biakan murni bakteri *Propionibacterium acnes* kemudian digoreskan pada bagian permukaan agar miring dalam tabung reaksi menggunakan media *Nutrient Agar* (NA) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Dewi *et al.*, 2019).

d. Pembuatan Suspensi *Propionibacterium acnes*

Bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah diremajakan diambil 1-2 ose, lalu disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan pengencer NaCl fisiologis. Setelah itu diukur nilai absorbannya dengan alat *Spektrofotometri UV-Vis* sampai diperoleh suspensi bakteri dengan nilai absorbansi 0,08-0,1 pada panjang gelombang 625 nm (setara dengan larutan standar McFarland 0,5) (Rosmania and Yanti, 2020).

e. Uji Aktivitas Antibakteri

Sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri uji diinokulasikan pada media NA, kemudian diratakan dengan *hockey stick* dan dibiarkan kering  $\pm 15$  menit. Lubang sumuran dibuat menggunakan *corck borner* dengan diameter 6 mm, kemudian beri tanda untuk masing-masing lubang. Menimbang ketiga formula krim, kontrol positif dan kontrol negatif masing-masing sebanyak 0,5 mg, lalu masukkan ke dalam lubang sumuran menggunakan mikropipet. Selanjutnya media diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Pengukuran diameter zona hambat dilihat dari zona bening disekitar lubang sumuran menggunakan jangka sorong. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali (Fathurrohim *et al.*, 2022).

f. Analisis Data

*Analysis of Variance* (ANOVA) digunakan dengan program SPSS 25 untuk menilai data dari zona hambat yang diperoleh. Sebelum dilakukan uji ANOVA, data terlebih dahulu diuji homogenitas dan normalitasnya sebagai prasyarat analisis data. Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak. Jika temuan uji signifikan pada tingkat signifikansi ( $\alpha = 0,05$ ), uji homogenitas akan menunjukkan bahwa setiap kelompok memiliki rata-rata varians yang sama. Jika persyaratan ini tidak terpenuhi, uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dilakukan dan jika perbedaan ditemukan, maka teruskan dengan uji *Mann-Whitney* (Anderiani, 2019).