

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian mengenai pembuatan sediaan salep dari ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata linn*) terhadap bakteri penyebab bisul (*Staphylococcus aureus*) dengan cara ekperimental laboratoris menggunakan metode *Simplex Latitice Design*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Penelitian FKIK UMY dan laboratorium Farmasi Biologi unit II UGM.

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2017 sampai dengan Juli 2017

C. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel penelitian

- a. **Variabel bebas** : kadar vaselin album, kadar adeps lanae.
- b. **Variable tergantung**: Diameter Zona Hambat, sifat fisis sediaan.
- c. **Variabel terkendali** : bakteri penyebab bisul (*Staphylococcus aureus*), konsentrasi ekstrak.

- d. **Variabel tidak terkontrol** : zat aktif dalam daun sirsak (*Annona muricata linn*)

2. Definisi Operasional

- a. Uji organoleptik

Uji organoleptik adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kondisi fisik sediaan berdasarkan penginderaan manusia meliputi bau, warna, bentuk dan tekstur sediaan.

- b. Uji homogenitas

Uji homogenitas adalah uji dilakukan untuk mengetahui tingkat tercampurnya suatu sediaan, dengan mengamati apakah terdapat butiran yang tidak larut dalam sediaan atau tidak.

- c. Uji viskositas

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kekentalan atau konsistensi yang akan mempengaruhi sediaan salep saat diaplikasikan semakin tinggi viskositas maka salep akan lebih tertahan atau dengan kata lain sulit menyebar ketika dioleskan pada kulit. Viskositas yang rendah lebih baik karena akan lebih mudah ketika diaplikasikan dengan botol semprot namun tidak mudah hilang dari permukaan kulit.

- d. Uji pH sediaan

Uji pH sediaan digunakan untuk mengetahui pH pada sediaan. pH adalah derajat keasaman atau kebasaan suatu zat atau larutan. pH normal memiliki nilai 7 sementara bila nilai $pH > 7$ menunjukkan zat tersebut memiliki sifat basa sedangkan nilai $pH < 7$ menunjukkan keasaman. pH 0 menunjukkan

derajat keasaman yang tinggi, dan pH 14 menunjukkan derajat kebasaan tertinggi. pH pada kulit memiliki rentang antara 4,5 sampai 6,5 sehingga salep topical yang akan di formulasi harus memiliki pH dengan rentang yang sesuai dengan pH kulit karena jika terlalu asam dapat menyebabkan iritasi dan jika terlalu basa dapat menyebabkan kulit menjadi kering. Umumnya indikator sederhana yang digunakan adalah kertas lakmus yang berubah menjadi merah bila keasamannya tinggi dan biru bila keasamannya rendah.

e. Daya sebar

Daya sebar digunakan untuk menjamin sediaan salep mudah diaplikasikan ke kulit dan tidak mudah hilang dan bergerak yang memiliki diameter sekitar 3,5-4,5 cm².

D. Instrumen penelitian

1. Alat penelitian

Nama Alat	Sumber/Merek dan Tipe
Pisau	HB Stainless®
Blender	Philip
<i>Rotary Evaporator</i>	Heidolph®
Penangas	Akebonno®
Oven	Shimadzu®
Inkubator	Memmert®
Autoklaf	All American®
Propipet	Glasfirt®
Mikropipet	Gilson®

Timbangan analitik	Casbee®
Alat-alat gelas	Pyrex®
Kertas label	Brand®
Kain hitam	
PH indicator	McolorpHast®
<i>Centrifuge</i>	Digisystem Laboratory Instruments®
<i>Laminar Air Flow (LAF)</i>	
Kapas lidi	
Ose steril	
<i>Paper disc</i>	
Pinset	
Perkamen	
Penggaris	

2. Bahan penelitian

No	Nama Bahan	Sumber/Merek dan Tipe
1	Daun sirsak	Karang Tengah, Imogiri, Bantul, DIY
2	Siprofloksasin Infus	Novell Pharmaceutical Laboratories®
3	Etanol 70%	Mandiri Surya® /Grade Teknis
5	Koloni <i>Staphylococcus aureus</i>	Laboratorium FKIK UMY

6	NaCl fisiologis	Laboratorium FKIK UMY
7	BHI	Laboratorium FKIK UMY
8	Aquadest	Laboratorium FKIK UMY
9	TSA	Laboratorium FKIK UMY
10	Vaselin album	Laboratorium FKIK UMY
11	Adeps Lanae	Laboratorium FKIK UMY

E. Cara kerja

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Farmasi Biologi unit II UGM.

2. Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan dilakukan dengan mengumpulkan daun sirsak kemudian daun yang udah terkumpul yang udah terkumpul dari desa Karangrejek, Karangtengah, Imogiri, Bantul, DIY sebanyak 2 kg dihilangkan pengotornya dengan air mengalir hingga bersih lalu ditiriskan. Selanjutnya, daun sirsak dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutupi permukaannya dengan kain hitam hingga 3-4 hari hingga menjadi simplisia kering.

3. Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Pertama bahan serbuk simplisia yang telah di dapat di desa Karangrejek, Karang Tengah, Imogiri, Bantul, DIY dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk halus. Serbuk

halus kemudian direndam dalam pelarut etanol 70% dengan perbandingan antara serbuk halus dengan pelarut adalah 1:10. Proses maserasi dilakukan selama 5 hari yang dilanjutkan dengan remaserasi selama 2 hari yang bertujuan untuk menarik sisa zat aktif yang belum larut pada etanol saat proses maserasi. Selama maserasi, sesekali serbuk digojog agar penyarian sempurna. Setelah 5 hari, rendaman serbuk disaring dan dipisah antara filtrat dengan ampas yang terbentuk. Filtrat yang telah dipisah akan diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak kental. Sedangkan ampas yang terbentuk tadi akan diremaserasi selama 2 hari. Proses untuk mendapatkan ekstrak kental dari remaserasi sama seperti pada proses maserasi.

4. Formulasi salep

Salep dibuat dengan komposisi 25% ekstrak yang telah dibuktikan oleh penelitian Hasmila dkk pada tahun 2015 bahwa dengan konsentrasi ekstrak 25% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Sediaan diformulasi dengan perbedaan basis vaselin album dan adeps lanae dengan kombinasi sebagai berikut:

Tabel 2. Formulasi salep ekstrak daun sirsak

No.	Komposisi	F1	F2	F3
1.	Ekstrak daun sirsak (g)	2,5	2,5	2,5
2.	Basis salep (Vaselin dan Adeps lanae) (g)	Vaselin 7,5	Vaselin 3,75 Adeps 3,75	Adeps 7,5

F1= vaselin : adeps lanae 100%:0%

F2= vaselin : adeps lanae 50%:50%

F3= vaselin : adeps lanae 0%:100%

Pembuatan salep ekstrak daun sirsak diawali dengan penimbangan bahan-bahan yang dibutuhkan. Setelah menimbang vaselin dan adeps lanae sesuai dengan masing-masing formula kemudian masukkan ke dalam mortir dan

ditambahkan vaselin album aduk hingga terbentuk massa salep sampai homogen. Lalu masukkan ekstrak daun sirsak ke dalam massa salep dan gerus menggunakan mortir hingga tercampur rata.

5. Pembuatan media TSA

Media TSA dibuat dengan cara sebanyak 125 g bubuk TSA dilarutkan dalam 1 liter aquades yang ditempatkan dalam Erlenmeyer 1 liter dan dipanaskan pada penangas air sambil diaduk hingga larut dan homogen dengan menggunakan batang pengaduk, kemudian disterilkan dengan oven 100° C selama 15 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam cawan petri dengan cara aseptis sampai memadat simpan dalam lemari es.

6. Pembuatan suspensi bakteri

Ambil beberapa koloni bakteri dengan ose steril dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis lalu digojok dengan menggunakan vortex sampai kelihatan tercampur merata. Selanjutnya inkubasi selama 2 jam pada suhu 37° C. Setelah itu larutan suspensi bakteri tersebut diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan menggunakan nutrisi BHI 9 ml dengan perbandingan 1 : 9 sambil dihomogenkan.

7. Pengujian Aktifitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan media agar (TSA). Suspensi bakteri diambil sebanyak 1 ml dengan menggunakan mikropipet lalu diletakan ditengah-tengah cawan petri berisi medium TSA yang sudah memadat. Kemudian diputar-putar cawan petrinya hingga suspensi bakterinya merata.

Dengan pinset steril yang telah dipijarkan diletakkan kertas cakram yang masing-masing telah ditotoli sampel (salep) dengan konsentrasi yang telah dibuat dan sediaan salep ekstrak daun sirsak (*Annona muricata Linn*), basis vaselin album, vaselin album dan adeps lanane, dan adeps lanae sebagai control negative. Kontrol positif berisi antibiotik ciproflaksasin sebanyak 10 µl yang akan digunakan sebagai pembanding. Kontrol positif ini berfungsi untuk membuktikan bahwa eksperimen yang dilakukan dapat menghasilkan hasil positif pada variabel tergantung, sedangkan kontrol negatif adalah kelompok tanpa perlakuan yang dimaksudkan untuk melihat tidak adanya perubahan pada variabel tergantung. Dalam cawan tersebut ditanamkan 7 buah cakram lalu diinkubasi selama 1 hari pada suhu 37°C, diamati dan diukur daerah hambatnya.

8. Evaluasi fisik sediaan

b. Uji organoleptik sediaan

Uji organoleptik dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan secara visual dengan cara pengamatan pada bau, warna, dan tekstur dari sediaan.

c. Uji homogenitas sediaan

Sediaan diuji homogenitasnya dengan cara mengoleskannya pada keping kaca preparat dan tutup dengankaca preparat lain. Kemudian melihat ada atau tidaknya partikel-partikel pada sediaan.

d. Uji daya sebar

Sebanyak 0,5 g salep diletakkan diatas kaca bulat yang berdiameter 15 cm, kaca lainnya diletakkan diatasnya dan dibiarkan selama 1 menit. Diameter sebar salep diukur. Setelahnya, ditambahkan 100 gr beban tambahan dan

didiamkan selama 1 menit lalu diukur diameter yang konstan yang terbentuk (Naibaho dkk, 2013)

e. Uji viskositas

Pengukuran viskositas menggunakan alat Viscometer. Kecepatan. Salep dimasukkan dalam wadah dan pasang portable viscotester amati pergerakan jarum pada viscometer.

f. Uji daya lekat

Oleskan salep pada area 2x2 cm pada objek gelas lalu letakkan objek gelas lain sedikit bergeser kemudian timpa dengan beban 1 kg selama 5 menit. Pasang alat uji yang sudah disambungkan dengan tali yang memiliki beban 80 g, perlahan lepaskan beban hitung waktu yang diperlukan hingga rekatan lepas dan replikasi 3x.

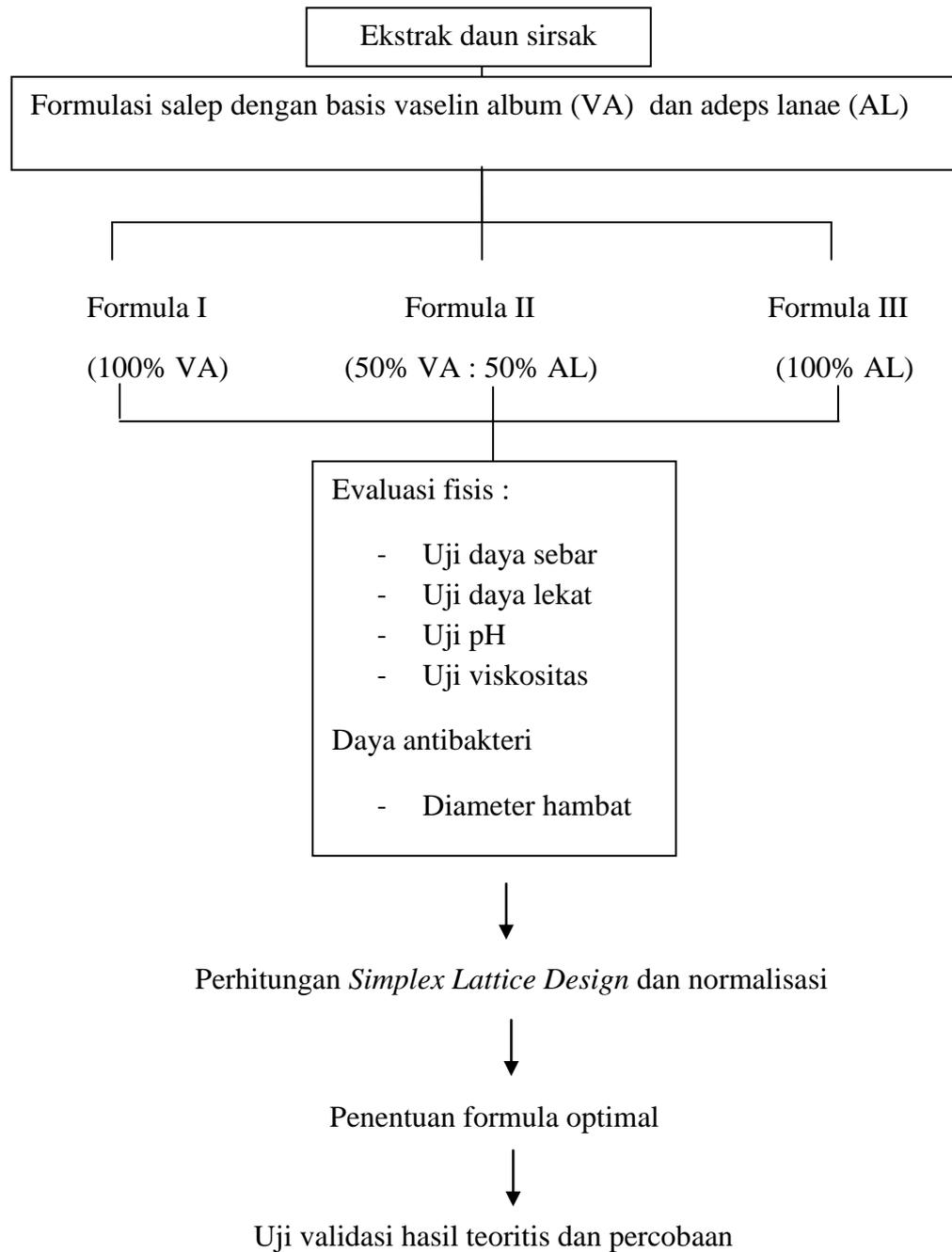
g. Uji pH sediaan

Uji pH sediaan dilakukan dengan mencelupkan stik pH indicator kemudian mencocokkan warnanya pada tabel yang telah tersedia dan lihat rentang pH yang terbentuk.

h. Uji daya sebar

Uji daya sebar dilakukan dengan cara salep ditimbang seberat 0,5 gram, kaca tak berskala ditimbang diletakkan di tengah lempeng kaca bulat berskala dengan diaat 150 gram, didiamkan selama 1 menit, kemudian dicatat penyebarannya.

F. Skema Langkah Kerja



G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengujian sifat fisis meliputi data pH, viskositas, pola penyemprotan, daya sebar, daya lekat sediaan salep wajah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L). Data yang diperoleh dari hasil pengujian sifat fisis dan antibakteri salep dengan metode Simplex Lattice Design dan dianalisis secara statistik menggunakan One Sample T-Test dengan taraf kepercayaan 95%. Metode One Sample T-Test digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh variasi konsentrasi adeps lanae dengan vaselin album terhadap masing-masing uji dilihat dari nilai signifikan pada output (NMA dkk, 2013)