

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan penelitian ini adalah eksperimental laboratorium.

B. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Dilakukan pada bulan Mei 2015 sampai dengan Januari 2016.

C. Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

- 1) Formula Gel Antiseptik : variasi konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah.
- 2) Uji Daya Antiseptik : Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah dalam sediaan gel antiseptik.

b. Variabel Terikat

- 1) Formula Gel Antiseptik : Karakteristik dari sediaan gel meliputi warna dan bau, perubahan pH, perubahan viskositas dan homogenitas.
- 2) Uji Daya Antiseptik : Jumlah koloni bakteri.

c. Variabel Terkendali

Bahan daun sirih merah yang digunakan berasal dari Kabupaten Magelang, Jawa tengah. Kecepatan dan suhu evaporasi dan Karbomer (Brataco[®]).

d. Variabel Tak Terkendali

Waktu dan kecepatan pengadukan pada pembuatan gel antiseptik ekstrak etanol daun sirih merah.

2. Definisi Operasional

- a. Maserasi adalah proses pengambilan zat aktif dari daun sirih merah dengan cara merendam serbuk daun sirih merah kedalam pelarut (etanol 70 %) selama 5 hari dengan bantuan pengadukan setiap harinya. Kemudian disaring untuk memisahkan ampas dan cairan yang mengandung zat aktif daun sirih merah.
- b. Evaporasi adalah proses pemekatan cairan yang mengandung zat aktif daun sirih merah hasil dari proses maserasi dengan suhu 50⁰C dan kecepatan 100 rpm.
- c. Variasi konsentrasi ekstrak adalah perbandingan kuantitas ekstrak etanol daun sirih merah dalam pelarut yang dinyatakan dalam satuan %.
- d. Karakteristik fisik adalah hasil yang didapat dari pengamatan sifat fisik gel antiseptik secara visual meliputi warna dan pH
- e. Waktu adalah lama sedikitnya waktu yang digunakan pada proses pembuatan sediaan gel antiseptik.

- f. Kecepatan pengadukan adalah besarnya kecepatan pengadukan pada saat proses pembuatan gel antiseptik.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan selama penelitian adalah penggaris, pipet ukur, pipet tetes, blender (Philips[®]), kulkas, bejana maserasi, cawan porselen, kain flanel, sarung tangan, masker, alat alat gelas yang lazim digunakan seperti gelas beker dan gelas ukur (Iwaki pyrex[®]), timbangan digital (Mettler Toledo[®]), oven, aluminium foil, ayakan nomer 30 mesh, kertas saring, batang pengaduk, rotary evaporator (IKA[®] RV10), waterbath (Memmert[®]), paper disk, pH meter (Mettler Toledo[®]), cawan petri, pipa kapiler, sinar UV 254 dan UV 366 nm, oven (Memmert[®]), Densitometer (Comac[®]), Komputer (hp[®]), tissue (Paseo[®] dan Nice[®]), pot gel (Brataco[®]), plastik.

2. Bahan penelitian

Daun sirih merah, etanol 70 % (Brataco[®]), TSA (E Merck[®]), Karbomer (Brataco[®]), gliserin (Brataco[®]), TEA (Brataco[®]), Aquadest (Brataco[®]), rutin, n-butanol (E Merck[®]), Asam asetat (E Merck[®]), NaCl (E Merck[®]).

E. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi untuk tanaman sirih merah dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM).

2. Pengumpulan dan Penyiapan Bahan

Bahan daun sirih merah yang diperoleh dari daerah Secang, Magelang, Jawa Tengah dibersihkan dari pengotor, selanjutnya dicuci dibawah air mengalir sampai bersih, tiriskan, lalu dikeringkan dengan dijemur dibawah sinar matahari yang diberikan tutup kain hitam pada bagian permukaan dengan tujuan agar simplisia tidak langsung terpapar sinar matahari, tunggu sampai simplisia menjadi kering, selanjutnya simplisia kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus. Serbuk diayak menggunakan ayakan nomer 30 mesh untuk menyamakan ukuran serbuk sebelum dilakukan proses ekstraksi (maserasi).

3. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi. Proses maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dengan pelarut etanol 70%. Perbandingan antara serbuk dan pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah 1:10 (Retno, 2006). Lama waktu yang diperlukan untuk proses maserasi adalah lima hari yang dilanjutkan dengan proses remaserasi selama dua hari. Selama proses maserasi dan remaserasi, pengadukan dilakukan setiap hari dengan tujuan agar proses penyarian zat dalam simplisia terjadi sempurna. Rendaman serbuk kemudian disaring dan dipisahkan antara filtrat (cairan) dengan ampas yang terbentuk. Filtrat maserat yang diperoleh dari maserasi dan remaserasi kemudian dicampur menjadi satu. Campuran filtrat yang telah dipisahkan kemudian diuapkan menggunakan rotari evaporasi sampai terbentuk

ekstrak kental). Langkah selanjutnya adalah perhitungan rendemen. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Depkes RI, 2000). Perhitungan rendemen dapat menggunakan persamaan 1.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak simplisia (gram)}}{\text{Berat Simplisia akhir (gram)}} \times 100\% \quad (1)$$

4. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan secara kualitatif dengan mereaksikan ekstrak etanolik daun sirih merah dengan dua tetes H₂SO₄ pekat dan 1 ml kalium dikromat. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Apabila terjadi perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan, maka ekstrak positif mengandung etanol (Robinson, 1995).

5. Uji Kandungan Senyawa flavonoid

Uji yang dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa flavonoid dalam ekstrak tersebut dilakukan dengan analisis kualitatif. Uji yang dilakukan adalah uji KLT. Bahan baku pembanding dalam uji ini adalah rutin. Fase gerak yang digunakan adalah n-butanol : asam asetat : air (BAA) dengan perbandingan (4:1:5 v/v). Fase diam yang digunakan adalah selulosa. Lempeng KLT dimasukkan ke dalam bejana yang telah terisi fase gerak kemudian tutup rapat. Penutupan bejana bertujuan untuk mencegah adanya penguapan dari fase gerak yang akan mengganggu jalannya proses elusi. Sebelum proses elusi dilakukan, harus dipastikan bahwa bejana yang akan digunakan telah jenuh oleh fase gerak,

proses penjuanan dilakukan menggunakan kertas saring yang diletakkan didalam bejana, kemudian ditutup rapat. Tujuannya adalah agar arah rambat pada proses elusi tidak miring sehingga tidak akan menyulitkan pada perhitungan Rf (Gandjar dan Abdul Rohman, 2007). Deteksi yang dilakukan adalah menggunakan sinar tampak , sinar UV 254 dan sinar UV 366 (Harborne, 1987). Rumus untuk menghitung Rf dapat dilihat pada persamaan 2.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh suatu komponen (b)}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut (a)}} \quad (2)$$

6. Formulasi Gel Antiseptik

Konsentrasi bahan untuk standar pembuatan sediaan gel dan rancangan formula sediaan gel antiseptik ekstrak tumbuhan pada penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 2 dan tabel 3, sedangkan tabel 4 mengenai rancangan formula sediaan gel antiseptik ekstrak daun sirih merah yang akan dilakukan.

Tabel 1. Konsentrasi bahan untuk standar pembuatan sediaan gel (Rowe et al, 2009)

Bahan	Konsentrasi
Ekstrak Tumbuhan	-
Karbomer	0,5 - 2%
Gliserin	≤30 %
TEA	2 - 4 %
Aquadest ad (ml)	Qs

Tabel 2. Rancangan formula sediaan gel antiseptik ekstrak tumbuhan (Sari dan Isadiartuti, 2006)

Bahan	F1	F2	F3	F4	F5
Ekstrak	0%	5%	10%	15%	20%
Karbomer	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
Gliserin	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
TEA	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
Natrium Metabisulfit	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%
Aquadest ad	200 ml				

Tabel 3. Rancangan formula sediaan gel antiseptik ekstrak daun sirih merah

Bahan	F1	F2	F3	F4	F5
Ekstrak	0%	2,5%	5%	10%	15%
Karbomer	1%	1%	1%	1%	1%
Gliserin	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %
TEA	1,5%	1,5%	1,5%	1,5%	1,5%
Metil Paraben	0,18%	0,18%	0,18%	0,18%	0,18%
Propil Paraben	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%
Aquadest ad	100 ml				
Ethanol 70 %	2 ml				

Langkah awal dalam pembuatan gel antiseptik ESM adalah pengembangan basis karbomer. Karbomer dikembangkan menggunakan air panas. Ekstrak daun sirih dilarutkan dengan gliserol sampai benar-benar larut, kemudian ekstrak tersebut dicampurkan ke dalam basis karbomer yang telah dikembangkan. Kemudian masukkan metil dan propil paraben yang telah dilarutkan dalam alkohol secukupnya aduk sampai homogen, langkah terakhir adalah ditambah air sampai volume yang dikehendaki, kemudian ditambah TEA sedikit demi sedikit sambil diaduk perlahan sampai homogen.

7. Evaluasi Sediaan gel

a. Uji Organoleptis

Pengamatan dilakukan secara langsung berkaitan dengan bentuk, warna dan bau dari sediaan gel yang telah dibuat.

b. Uji Homogenitas

Pengujian ini dilakukan dengan cara sampel gel antiseptik ekstrak daun sirih merah dioleskan pada kaca preparat dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x. sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Ditjen POM,1985).

c. Uji Perubahan pH

Pengujian pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter. probe pH meter dicelupkan pada sediaan dan hasil pH dapat dilihat langsung pada alat yang telah terhubung pada probe pH meter. pH sediaan yang diinginkan adalah 4,5 – 6,5 sesuai dengan pH kulit manusia (Draeos dan Lauren, 2006).

d. Uji Perubahan Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menempatkan sampel dalam viskometer Brookfield DV-E hingga spindel terendam. Diatur spindel dan kecepatan yang akan digunakan. Viskometer Brookfield DV-E dijalankan, kemudian viskositas dari gel akan terbaca (Septiani dkk., 2011).

e. Uji Daya lekat

Sampel 0,25 gram diletakkan diantara 2 gelas obyek, kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu beban diangkat dari gelas obyek, kemudian pasang gelas obyek pada alat test (tali). Alat uji diberi beban 80 gram dan kemudian dicatat waktu pelepasan gel dari gelas obyek (Miranti, 2009).

f. Uji Daya Sebar

Ditimbang berat kaca arloji 1(K1) dan kaca arloji 2 (K2). Kemudian timbang sebanyak 1 gram sediaan gel dan letakkan dengan hati-hati di atas K1. Selanjutnya ditutup dengan K2, tunggu 1 menit, kemudian ukur diameternya. Langkah selanjutnya berikan pemberat diatasnya hingga bobot mencapai 500 gram, kemudian diukur diameter yang terbentuk setelah 1 menit (Niyogi et al.,2012).

8. Uji Efektivitas Daya Antiseptik

Pengujian efektivitas daya antiseptik dilakukan dengan metode replica sebelum dan sesudah penggunaan gel. Pengujian sebelum penggunaan gel diawali dengan cara tangan dicuci dengan air yang mengalir pada kran dan didiamkan sampai kering, Lakukan swabbing pada telapak tangan menggunakan kapas lidi steril yang

sebelumnya telah direndam pada NaCl. Bakteri yang terdapat pada kapas lidi tersebut kemudian digoreskan (swabbing) pada media TSA. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh.

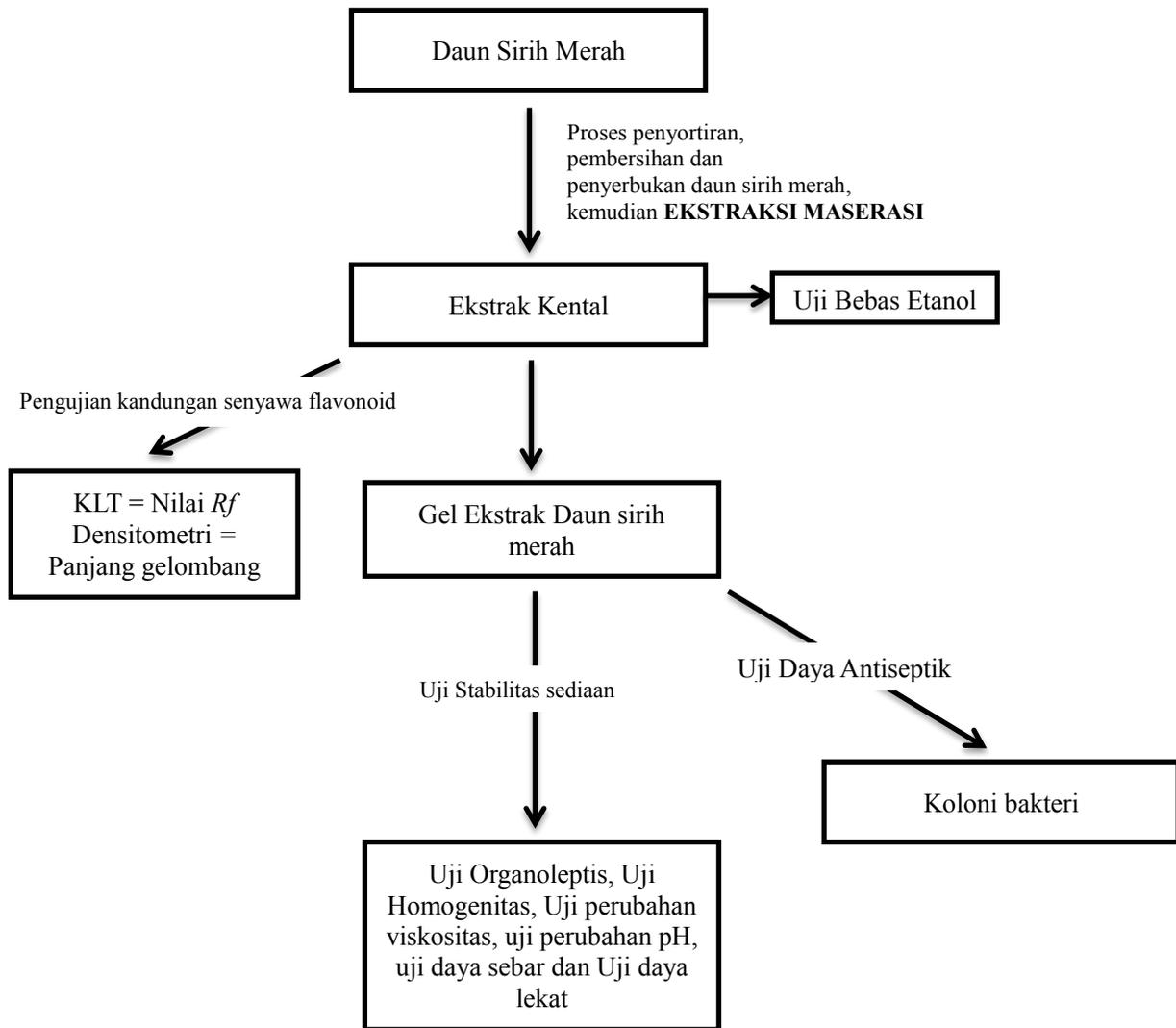
Kemudian pengujian setelah penggunaan gel antiseptik ESM, gel kontrol negatif dan gel kontrol positif, telapak tangan ditetesi dengan sediaan gel (gel antiseptik ESM, gel kontrol negatif dan gel kontrol positif), kemudian ratakan pada telapak tangan. Langkah selanjutnya adalah swabbing. Langkah tersebut sama dengan pengujian sebelum menggunakan gel. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C, kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh.

F. Skema Langkah kerja

Skema langkah kerja diawali dengan pembuatan ekstrak daun sirih merah. Pembuatan ekstrak diawali dengan proses ekstraksi dengan metode maserasi selama 5 hari dan remaserasi selama 2 hari. Kemudian dilanjutkan dengan proses rotary evaporation (penguapan) sampai terbentuk massa yang kental (ekstrak). Kemudian dihitung rendemen yang dihasilkan.

Langkah selanjutnya adalah uji bebas etanol untuk mengetahui ada atau tidaknya etanol dalam ekstrak dan dilanjutkan dengan uji KLT untuk mengetahui apakah terdapat senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antiseptik. Hitung R_f yang dihasilkan dari uji KLT. Untuk lebih memastikan bahwa senyawa flavonoid terdapat pada ekstrak daun sirih merah (ESM), maka lempeng hasil uji KLT di amati kembali menggunakan densitometer. Lihat panjang gelombang yang dihasilkan.

Proses terakhir adalah pembuatan sediaan gel antiseptik ESM. Proses tersebut diawali dengan optimasi sediaan. Setelah itu hasil dari optimasi sediaan digunakan sebagai acuan pembuatan sediaan gel antiseptik ESM. Setelah sediaan gel dibuat, langkah selanjutnya adalah uji karakteristik sediaan gel yaitu uji organoleptik, uji homogenitas, uji perubahan pH, uji perubahan viskositas, uji daya lekat, dan uji daya sebar selama 7 minggu. Langkah terakhir adalah uji efektifitas daya antiseptik dengan cara membandingkan jumlah koloni yang tumbuh sebelum dan sesudah menggunakan gel antiseptik ESM. Skema langkah kerja dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 1. Skema Langkah Kerja

G. Analisis Data

Hasil nilai Rf uji KLT ekstrak sirih merah akan dibandingkan dengan nilai Rf uji KLT dari rutin sebagai pembanding. Setelah itu nilai Rf Ekstrak sirih merah akan dibandingkan dengan nilai Rf yang ada pada pustaka untuk mengetahui jenis flavanoid yang ada pada ekstrak sirih merah (Mursyidi, 1990).

Hasil dari uji karakteristik fisik sediaan gel yang diperoleh dengan replikasi tiga kali akan seperti penurunan pH, viskositas dan daya lekat akan disajikan sebagai rata-rata dan daya sebar dalam bentuk gambar. Sedangkan untuk hasil Penurunan jumlah koloni bakteri akan disajikan sebagai persentase penurunan antara sebelum dan sesudah penggunaan gel antiseptik ekstrak sirih merah. Kemudian dilakukan regresi linier untuk menentukan hubungan antara konsentrasi ekstrak (X) dengan Penurunan jumlah koloni bakteri (Y).

Uji statistika yang dilakukan hanya pada uji daya antiseptik. Uji yang dilakukan antara lain uji paired sample t test untuk mengetahui signifikansi penurunan jumlah koloni bakteri antara sebelum dan sesudah menggunakan gel antiseptik. Kemudian dilakukan uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk melihat signifikansi perbedaan penurunan pada tiap sediaan, yaitu pada gel kontrol positif, F1, F2, F3, F4 dan F5 karena mempunyai nilai tidak normal pada uji normalitas. Uji statistika yang terakhir adalah korelasi dan regresi.