

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian uji efektivitas gel *hand sanitizer* kombinasi ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifollius Roxb.*) dengan alkohol & triklosan secara *in vitro* serta menguji karakteristik sediaan gel *hand sanitizer* ekstrak etanol pandan wangi (*Pandanus amaryllifollius Roxb*) ini menggunakan desain penelitian eksperimental.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan bulan Desember 2018 sampai bulan Juni 2019

C. Subyek Penelitian

1. Bahan Uji : Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifollius Roxb*)
2. Subyek penelitian : Bakteri *Eschericchia coli*

D. Identifikasi variabel penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a) Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*)
- b) Variabel tergantung : Diameter zona hambat dan sifat fisik gel *hand sanitizer* (pH, daya sebar, daya rekat dan viskositas)
- c) Variabel terkendali : Media NA, waktu inkubasi bakteri dan bahan formulasi (triklosan, alkohol 70%, carbopol, gliserin, metil paraben, triethanolamine dan aquadest).

2. Definisi Operasional

- a) Ekstrak *Pandanus amaryllifolius Roxb* adalah hasil ekstraksi daun *Pandanus amaryllifolius Roxb* dengan menggunakan metode maserasi menggunakan larutan penyari etanol 96% selama 5 hari
- b) Hand sanitizer ekstrak *Pandanus amaryllifolius Roxb* adalah gel ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) dengan konsentrasi 0,5%, 0,75%, 1% dan 1,25%
- c) Diameter zona hambat bakteri adalah area bening yang muncul di sekitar lubang sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan selama penelitian adalah penggaris (Butterfly®), pipet ukur (Iwaki®), pipet tetes, tabung besar untuk maserasi, kain flanel, sarung tangan (Handseol®), masker (Sesi®), timbangan digital

(Toledo®), gelas beker (Iwaki®), gelas ukur (Iwaki®), cawan petri(Iwaki®),cawan porselen (Iwaki®), aluminium foil (Diamond®), ayakan, kertas saring (Whatman®), pH meter (Toledo®), batang pengaduk (Iwaki®), dan waterbath

2. Bahan Penelitian

Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) etanol 96%, Media plate Count Agar (PCA) (Brataco®), Triklosan (Brataco®), Gliserin (Brataco®), TEA (Brataco®), Alkohol 70% (Brataco®), Carbomer 940 (Brataco®), Metil Paraben (Brataco®) dan Aquadest (Brataco®)

F. Tahap Penelitian

1. Pembuatan *Hand sanitizer*

a) Bahan daun pandan wangi

Serbuk daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) didapatkan dari CV Herbal Anugrah Alam, Yogyakarta

b) Pembuatan Ekstrak Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*)

Penelitian ini menggunakan metode maserasi dalam pengambilan zat aktif dari simplisia *Pandanus amaryllifolius Roxb*. Proses ekstraksinya dilakukan dengan memasukan ke dalam bejana 500 gram serbuk daun *Pandanus amaryllifolius Roxb* lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 5 Liter dan bejananya ditutup rapat serta dijauhkan dari paparan sinar matahari langsung. Proses maserasi dilaksanakan dalam waktu 5 hari serta dilakukan pengadukan setiap hari. Kemudian dilakukan proses remaserasi selama 2 hari dengan menanamkan

pelarut etanol 96% sebanyak 2,5 Liter. Tahapan berikutnya melakukan penyaringan menggunakan kain flannel dan kertas saring agar tidak ada pengotor yang ikut didalam cairan yang diambil. Kemudian pengentalan filtrat dengan menguapkan etanol di *rotary evaporator* dengan suhu 40°C. Kemudian filtrat di masukan kedalam cawan porselen diatas penangas air pada suhu 40 °C hingga terbentuk ekstrak kental.

c) Identifikasi senyawa flavonoid

Ekstrak diambil 0.10 gram dan ditambahkan 5 ml aquadest dan dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 1 ml HCl pekat dan sedikit serbuk Mg, lalu dikocok dan jika mengandung flavonoid maka akan menimbulkan warna merah, kuning atau jingga (Harbone, 1987).

d) Uji polifenol

Ekstrak diambil 0,10 gram lalu ditambahkan aquadest 5 ml dan dididihkan selama 5 menit. Kemudian disaring sehingga mendapatkan filtrat. Filtrat yang didapatlkan ditambahkan FeCl 1% sebanyak 5 tetes dan diamati perubahan warna yang terjadi. Adanya senyawa polifenol ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hijau biru hingga hitam (Setiabudi dan Tukiran, 2017)

e) Identifikasi senyawa alkaloid

Ekstrak diambil 0,5 gram dan ditambahkan 20 ml HCL 2N. Kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, setelah itu didinginkan dan disaring. Filtrat tersebut dibagi menjadi 2 untuk

merekasikan pengujian alkaloid dengan ditetaskan pereaksi Mayer dan Dragendroff. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan adanya endapan (Jaafar dkk.,2007).

f) Identifikasi senyawa tanin

Ekstrak diambil 300 mg ditambahkan aquadest 10 ml dan dipanaskan diatas waterbath selama 30 menit. Filtrate kemudian ditambahkan larutan NaCL 2% 1ml, jika adanya suspensi atau endapan maka disaring menggunakan kertas saring. Filtrat ditambahkan 5 ml larutan gelatin 1%. Adanya kandungan tanin ditandai dengan terbentuknya endapan (Tiwari dkk., 2011)

g) Formulasi *Hand Sanitizer*

Formulasi gel *hand sanitizer* ekstrak (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) pada konsentrasi 0,5%, konsentrasi 1%, konsentrasi 1,5%, konsentrasi 2% dan kontrol negatif dapat dilihat pada Tabel 1

h) Cara Pembuatan *hand Sanitizer*

Pembuatan gel *hand sanitizer* ekstrak (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) diawali dengan mengambil 0.25 gram carbopol, kemudian carbomer diletakkan pada mortir lalu dicampur aquadest sebanyak 10 ml dan diaduk cepat sampai terbentuknya masa gel. Ditambahkan TEA sebanyak 0,15 gram, mengambil Metil paraben 0,1 gram lalu dilarutkan dengan alkohol 70% 5 ml di dalam mortir dan diaduk hingga homogen. Mengambil triklosan 0,25 gram kemudian dilarutkan alkohol 70%

sebanyak 20 ml dan diaduk sampai semua campuran homogen (Shu, 2013)

Tabel 1. Formula sediaan gel *hand sanitizer* ekstrak *Pandanus amaryllifolius Roxb*

Bahan	Konsentrasi	Berat Bahan				
		F1	F2	F3	F4	F5
Ekstrak <i>Pandanus amaryllifolius Roxb</i> (gram)		0	0,25	0,375	0,5	0,625
Trikloran (gram)	0,50%	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Alkohol 70% (ml)	70%	30	30	30	30	30
Carbopol (gram)		0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Gliserin (gram)	1%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Metil paraben (gram)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEA (gram)	0,30%	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Aquadest add (ml)		50	50	50	50	50

Keterangan F1: Tanpa ekstrak
 F3 : Konsentrasi 0,75%
 F5 : Konsentrasi 1,25%

F2 : Konsentrasi 0,5%
 F4 : Konsentrasi 1%

2. Evaluasi Sediaan Gel *Hand sanitizer*

a) Uji Organoleptis

Pengamatan dilakukan secara langsung terkait dengan bentuk, warna dan bau pada sediaan gel *hand sanitizer* ekstrak daun (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) (Ansel, 1998).

b) Uji homogenitas

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengoleskan 1 mg gel *hand sanitizer* ekstrak daun (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) pada kaca preparat dan ditutup menggunakan kaca preparat. Kemudian diamati susunan homogen serta partikelnya serta menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40x (Ansel, 1998).

c) Uji Viskositas

Pengujian ini menggunakan alat viskometer Rheosys Merlin VR II. Sediaan gel dimasukan ke dalam wadah *cup* hingga *bob* terendam dan dipasangkan dengan instrumen viskometer.

d) Uji Daya Sebar

Pengujian ini dilakukan dengan menimbang 0,5 gram gel *hand sanitizer*, lalu gel yang udah ditimbang diletakkan diatas gelas arloji dan gelas arloji yang sudah disiapkan di letakkan pada gelas arloji yang berisi gel tersebut dan diberi beban 50 gram sampai 500 gram. Kemudian setelah 1 menit diukur diameter sebaranya dengan cara menghitung dan mencatat diameter sebaranya pada gelas arloji (ansel, 1998).

e) Uji Daya Rekat

Pengujian dilakukan dengan cara mengoleskan 0,5 ml gel *hand sanitizer* pada obyek gelas, lalu ditindih dengan obyek gelas lain. Selama 5 menit ditambahkan beban 1 kg dan pada alat uji ditambahkan berat 50 gram. Melakukan penghitungan waktu sampai lepasnya rekatan saat beban 1 kg dilepas (Ansel, 1998)

3. Persiapan Uji Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Sebelum melakukan penelitian maka alat- alat yang digunakan disterilkan dahulu agar terhindar dari cemaran mikroba. Semua alat yang akan digunakan harus distrerilkan menggunakan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C. Alat yang akan digunakan antara lain; *erlenmeyer*, tabung reaksi, cawan petri dan perforator.

b. Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli*

Pembuatan suspensi bakteri menggunakan standar Brown III CFU/ml. Suspensi bakteri *Escherichia coli* diambil 1 ose menggunakan jarum ose steril dan dimasukkan ke dalam larutan NaCL serta diaduk hingga homogen. Kemudian diencerkan sesuai dengan standar 10⁴ CFU/ml.

c. Pembuatan Media Nutrien Agar

- 1) Nutrien Agar ditimbang 3,5 gram dan dilarutkan dalam aquades 150 ml sampai homogen.
- 2) Larutan kemudian dipanaskan sampai mendidih dan larut.
- 3) Selanjutnya larutan disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian larutan tersebut dituangkan pada petridish yang sudah di sterilkan sebanyak 20 ml/ petridish

4. Uji Antibakteri

- a. Suspensi bakteri *Escherichia coli* yang sudah siap dituangkan ke dalam cawan petri sejumlah 1 ml ke media NA
- b. Dibuat sumuran pada cawan petri menggunakan alat perforator

- c. Tiap sumuran pada cawan petri diisi 1 ml sediaan gel hand sanitizer daun pandan wangi dengan penambahan alkohol dan triklosan (Basis, Formula 1, Formula 2, Formula 3 dan Formula 4), kontrol positif dan kontrol negatif
- d. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18- 24 jam
- e. Dihitung luas zona beningnya dengan penggaris

G. Analisis data

Data hasil uji kualitas gel hand sanitizer dibandingkan secara deskriptif dengan membandingkan pada nilai rujukan gel *hand sanitizer*. Data hasil uji aktivitas antibakteri berupa zona hambat dianalisis menggunakan Kruskal- Wallish dilanjutkan *post hoc* Mann Whitney dengan $p < 0,05$

H. Skema Langkah Kerja

1. Pembuatan Ekstrak dan *Hand Sanitizer*

