

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni s.d. Juli 2024 dilakukan pada dua lokasi yang berbeda yaitu :

1. Laboratorium Sistematika Tumbuhan Universitas Sumatera Utara Jl. Bioteknologi No.1 Kampus USU Medan untuk Identifikasi dan Determinasi Tumbuhan.
2. Laboratorium Mikrobiologi Kampus IV UINSU Jl. Lap. Golf, Kp. Tengah Kec. Pancur Batu untuk Ekstraksi dan Pengujian Antibakteri.
3. Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Jl. Bioteknologi No. 1 Kampus USU Padang Bulan Medan untuk Uji Fitokimia.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol sampel, plastic wrapping, blender, tisu, kapas steril, beaker glass, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri, labu takar, balon karet dan pipet ukur, pipet volume, corong kaca, jarum ose, rak dan tabung reaksi, autoklaf, oven, inkubator, Laminar Air Flow Cabinet, pH meter, spatula, batang pengaduk, bunsen, magnetic stirer, rotary evaporator, lemari pendingin, timbangan analitik, stopwatch, swab steril, kertas cakram, jangka sorong digital, kertas saring, dan objek glass.

Adapun bahan-bahan yang mesti dipersiapkan adalah daun saga 10kg, etanol 70%, aquades, bakteri *Propionibacterium acnes*, media Mueller Hinton Agar, NaCl 0,9%, klindamisin 1%, akuadest, gliserin, HMPC, PVA, Phenoxyetanol dan TEA.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian uji aktivitas antibakteri pada formulasi masker wajah ekstrak daun saga untuk bakteri *Propionibacterium acnes* dianalisa 2 faktor yaitu, terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dan sediaan masker dengan variasi konsentrasi ekstrak daun saga yakni tanpa perlakuan ekstrak daun saga dan menggunakan ekstrak daun saga dengan konsentrasi 3%, 5 %, 7%, dan 9%. Untuk kontrol positif

digunakan klindamisin sebagai K1 dan The Originote Hyalucera Moisturizer Gel sebagai K2, sedangkan kontrol negatif digunakan Akuadest steril.

3.4 Prosedur Kerja

1. Identifikasi Tumbuhan

Identifikasi tumbuhan merupakan menetapkan identifikasi suatu tumbuhan yaitu dengan menentukan namanya yang benar dan tempatnya yang tepat dalam sistem klasifikasi tumbuhan. Istilah identifikasi disebut juga dengan determinasi yang merupakan pengumpulan data dengan mengidentifikasi jenis daun yang akan diamati secara morfologi dan dilakukan identifikasi dengan kunci determinasi (Suwila, 2014).

2. Pembuatan Simplisia

Pelaksanaan penelitian diawali dengan pembuatan simplisia daun saga. Daun saga sebanyak 10 kg dibersihkan menggunakan air mengalir, dikeringkan pada suhu ruang selama 1-2 minggu. Daun saga yang sudah kering dicincang halus dan ditimbang sebanyak 500 gram. Pengeringan dilanjutkan di dalam lemari pengering. Lalu ditimbang kembali untuk mengetahui susut pengeringannya, kemudian bahan diserbuk.

3. Ekstraksi Simplisia

Pembuatan ekstrak simplisia dilakukan dengan metode maserasi yaitu direndam sebanyak 500 gram serbuk simplisia daun saga dengan pelarut sebanyak 1500 ml etanol 70 % dalam wadah berbahan kaca atau maserator dan disimpan di suhu kamar dalam botol gelap selama 3 hari sambil diaduk sesekali. Filtrat hasil penyarian dilakukan dengan menggunakan kertas saring whatman. Residu yang diperoleh kemudian dilakukan maserasi kembali atau remaserasi, selama 2 hari lagi. Kemudian filtrat yang diperoleh disatukan lalu diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk menghasilkan ekstrak etanol daun saga yang kental (Adrian, 2002). Dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C (Rasydy, 2019).

4. Skrining Fitokimia

Pengujian skrining fitokimia dilakukan setelah memperoleh ekstrak kental daun saga meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan tanin.

a. Uji Flavonoid

Dimasukkan 2 ml sampel ekstrak etanol daun saga dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 20 ml aquadest steril . Sebanyak 0,5 ml filtrat ditambahkan 5 ml ammonia encer dan 5 ml asam sulfat pekat kemudian diamati dengan terbentuknya warna pada uji flavonoid yaitu warna merah, orange, dan hijau tergantung dari struktur flavonoid yang terkandung dalam sampel tersebut.

b. Uji Saponin

Sebanyak 2 ml sampel ekstrak etanol daun saga dituang ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas kemudian didinginkan. Kocok kuat-kuat selama 10 detik. Adanya buih yang mantap tidak kurang dari 10 menit mencapai ketinggian 3 cm maka positif adanya saponin (Kharunnisa, 2021).

c. Uji Alkaloid

Sebanyak 2 ml ekstrak etanol daun saga ditambahkan 0,5 HCL 2 %. 2 tabung digunakan untuk memisahkan larutan. Tabung pertama ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendrof, tabung kedua ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer (sundu, 2018).

d. Uji Steroid

Sebanyak 2 ml dimasukkan dicampur dengan 1 ml kloroform. Selanjutnya campuran tersebut diaduk. Dua tetes asetat anhidrida dan asam sulfat pekat ditambahkan ke dalam filtrat. Solusi awalnya menunjukkan warna merah, diikuti oleh perubahan berikutnya menjadi biru dan hijau, yang secara kolektif menandakan hasil yang positif (Khairunnisa, 2021).

e. Uji Tanin

Sebanyak 2 ml ekstrak etanol daun saga dituang ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml air panas, lalu ditetesi $FeCl_3$, eksistensi tanin pada sampel ditandai dengan adanya rona hijau kehitaman (Khairunnisa, 2021).

5. Sterilisasi Alat dan Media

Tahap sterilisasi menggunakan alat dan bahan yang akan digunakan, disiapkan terlebih dahulu kemudian dicuci sampai bersih dan dikeringkan. Lalu

tahap sterilisasi basah dengan menggunakan uap air jenuh bertekanan (autoklaf) dan oven. Untuk alat di dalam autoklaf, dibungkus dengan kertas dan dimasukkan dalam plastic tahan panas dengan tekanan 1,5 atm pada waktu 15-20 menit dan suhu 121°C. Alat dan bahan yang di sterilkan dengan autoklaf seperti media pertumbuhan mikroba. Sedangkan oven untuk alat seperti logam dan gelas dengan sterilisasi panas kering pada suhu 180°C (Astuti, 2021).

6. Uji Aktivitas Antibakteri Pada Ekstrak Daun Saga

Perlakuan uji adalah dengan membuat media MHA terlebih dahulu, dan disiapkan bakteri *Propionibacterium acnes*. Kemudian dibuat larutan NaCl 0,9 % dan inokulum Mc Farland, dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antibakteri. Pertama dilakukan adalah dengan ditimbang media MHA seberat 15,2 gram lalu diencerkan dengan akuades 400 ml dan dimasak hingga mendidih. Selanjutnya adalah pensterilan media di autoklaf dengan temperatur 121°C selama 15 menit didinginkan hingga suhu 45°C, lalu diisi ke dalam petri steril didiamkan hingga agar tersebut memadat. NaCl 0,9 % dibuat dengan ditimbang media 0,9 gram, dicampurkan dengan air suling 100 ml, kemudian menghomogenkan larutan dan disterilisasi kembali dengan autoklaf temperatur 121°C selama 15 menit, setelah itu dipindahkan ke tabung reaksi 10 ml (Emelda, 2021).

Tahap selanjutnya adalah pembuatan inokulum Mc Farland, yaitu 0,5 Mc Farland dari 1 koloni pada NaCl fisiologis 2 ml selama 15 menit. Dilanjutkan dengan dimasukkan swab steril lalu diangkat dari inokulum bakteri dan ditekan perlahan pada dinding tabung. Swab tersebut digores kuadran memutar pada media MHA sebanyak 4 kali sehingga tergoresla seluruh permukaan dan digores juga sekitar pinggiran cawan petri (Wanger, 2009). Media kemudian diberi kertas cakram steril yang terbuat dari kertas Whatman no 1 diameter 6 mm. Kertas cakram steril diteteskan larutan ekstrak etanol pekat (K-, K+ atau K1, dan ekstrak daun saga 3%, 5%, 7%, dan 9%) masing masing ditempel di atas permukaan media. Keseluruhan dari cawan petri tersebut selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan prosedur observasi untuk melihat skala diameter zona hambat yang terlihat pada agar yang diukur menggunakan vernier caliper digital dengan satuan milimeter.

7. Pengukuran Diameter Zona Hambat

Metode difusi cakram Kirby Bauer, dengan penemu Bernama Wiliam Kirby-Alfred Bauer tahun 1966. Pengukuran diameter zona hambat ekstrak daun saga terhadap *Propionibacterium acnes* dapat dilihat dari zona bening disekitar kertas cakram dengan masing-masing konsentrasi disekitar cakram. Indeks antimikroba berguna untuk mengukur daya hambat dengan menggunakan vernier caliper :

Diameter Zona Hambatan – Diameter Cakram

Diameter Cakram

Menurut David dan Ambarwati dalam hafsari *et al.*, (2015), Kriteria zona hambat berdasarkan tingkat penghambatan bakteri dikategorikan lemah jika zona hambat 5 mm atau kurang, sedang jika 5-10 mm, dan kuat jika 10-19 mm, dan sangat kuat jika >20 mm.

8. Pembuatan Sediaan Masker Gel

Formulasi sediaan masker gel, pada hasil dua zona hambat terbesar (X_1 & X_2) dari uji aktivitas yaitu :

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Daun Saga

Bahan	Konsentrasi (%)		Kegunaan
	F1	F2	
Ekstrak etanol daun saga	X_1	X_2	Zat aktif
HPMC	1	1	Gelling agent
PVA	10	10	Plasticizer
Gliserin	15	15	Humektan
Phenoxyetanol	0,5	0,5	Pengawet
Etanol 70 %	12,5	12,5	Pelarut
Aquadest	100	100	Pelarut
	mL	mL	

Formulasi masker gel yaitu, dengan dipanaskan aquadest steril sejumlah 100 ml hingga temperatur 80°C lalu diangkat. PVA dimasukkan dalam beaker glass

dikembangkan dengan aquadest panas 55 ml selama 15 menit diaduk sampai homogen (wadah 1), HPMC dilarutkan dengan aquadest panas kurang lebih 20 kali masa HPMC selama 30 menit hingga mengembang (wadah 2), phenoxyetanol 0,5 ml (wadah 3). Kemudian dengan waktu bersamaan wadah 2 dan 3 dicampurkan sedikit demi sedikit kedalam wadah 1 dan TEA diaduk semua bahan hingga tercampur dengan homogen. Selanjutnya ditambahkan akuadest sampai 100 ml diaduk hingga homogen untuk sediaan tanpa produk ekstrak daun saga, pembuatan masker gel dengan penambahan ekstrak etanol daun saga X_1 dan X_2 yang dilarutkan dengan etanol 70% dimasukkan kedalam campuran tadi dan terakhir bahan dimasukkan ke basis gel dihomogenkan (Wardaniati dan Islami, 2020).

9. Uji Organoleptik Pada Sediaan Masker Gel

Pada uji organoleptik diamati secara visual sediaan masker gel yang meliputi warna, bau bentuk, dan tekstur permukaan gel. Uji organoleptik berdasarkan Tingkat kesukaan dari sediaan masker gel dengan spesifikasi tertentu yang nantinya akan ditransformasikan ke dalam numerik. Skala yang digunakan dalam Tingkat kesukaan adalah sangat suka (1), suka (2), netral (3), tidak suka (4), dan sangat tidak suka (5). Jumlah panelis 15 orang dewasa (>18 tahun) (Hasanah, 2020).

10. Uji pH Pada Sediaan Masker Gel

Sebelum mengevaluasi pH, dilakukan kalibrasi pH meter melalui metode buffer pH 4 (asam), 7 (netral), dan 10 (basa). Langkah ini dilakukan untuk memastikan bahwa pH meter dalam keadaan normal. Elektroda dibilas sebelum dan sesudah pengukuran menggunakan akuades. Diencerkan 1 gram sediaan masker gel dengan 1 ml akuades dan dihomogenkan, kemudian dicatat hasil pH setelah angka stabil dan tidak bergerak (Wardaniati & Islami, 2020). pH sebaiknya memenuhi syarat batas pH kulit yaitu 4,5-6,5, jika pH terlalu asam maka berdampak iritasi, dan kulit akan kering jika terlalu basa (Hasyim *et al.*, 2022).

11. Uji Waktu Mengering Pada Sediaan Masker Gel

Prosedur waktu mengering pada sediaan masker gel dapat diobservasi pada kaca objek yang dioleskan 1 gram untuk mengetahui lama waktu setiap sediaan kehilangan kadar airnya (mengering) dengan bantuan stopwatch (Phindo, 2016).

12. Uji Iritasi Aplikasi Sediaan Masker Gel

Pengujian iritasi sediaan masker gel dilakukan kepada 15 panelis dewasa (>18 tahun) yang diaplikasikan sediaan masker gel pada kulit memicu adanya aktivitas iritasi seperti reaksi gatal, kemerahan, bahkan rasa panas pada kulit panelis. Pengujian dioleskan ke bagian leher ataupun tangan yang diinginkan dan didiamkan selama 15 menit, jika tidak terjadi iritasi ditandai dengan simbol (-), jika timbul gatal maka diberi simbol (+), jika merah dan adanya rasa panas maka dengan simbol (++) (Musdalipah, 2018).

13. Uji homogenitas Pada Sediaan Masker Gel

Uji homogenitas sediaan masker gel yaitu dengan mengoleskan masker gel 0,1 gram pada preparat *glass* sebab lebih tipis dan transparan dan ditutup lagi dengan preparat *glass*. Kemudian dilakukan observasi homogenitas sediaan masker gel ditandai dengan tidak terdapat partikel bergerombol serta sediaan halus merata pada preparat *glass* (Slamet *et al.*, 2020).

14. Uji Aktivitas Antibakteri Pada Sediaan Masker Gel

Metode yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri sediaan masker gel yaitu dengan metode difusi cakram karena mudah dilakukan dan sebagai bahan yang dapat menyerap ekstrak yang digunakan dan ditempatkan pada media pertumbuhan bakteri. Pengujian diperoleh zona hambat pada F0 (tanpa ekstrak), formula yang paling baik pada 2 formula yaitu F1 dan F2, dan Kontrol positif sebagai K2 yaitu Originote Hyalucera Moisturizer Gel ditempatkan pada permukaan media padatan selanjutnya pada diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan prosedur observasi untuk melihat skala diameter zona hambat yang terlihat pada agar.