

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai Agustus 2024 dan dilaksanakan pada tiga lokasi yang berbeda yaitu :

1. Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara Jl. Lapangan Golf No. 120 Kp. Tengah, Kec. Pancur Batu, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara, untuk penelitian Efektivitas Salep Ekstrak Etanol Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Penyebab Infeksi Kulit (*Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa*).
2. Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Hayati FMIPA Universitas Sumatera Utara Jl. Bioteknologi No. 1, Padang Bulan, Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera Utara, untuk pembuatan ekstrak cengkeh dan uji skrining fitokimia ekstrak cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.).
3. Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan Jl. Garu II A, Harjosari I, Kec. Medan Amplas, Kota Medan, Sumatera Utara, untuk pengujian uji daya lekat dan daya sebar terhadap salep ekstrak etanol cengkeh.

3.2. Alat Dan Bahan

3.2.1. Alat Penelitian

Adapun alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain timbangan analitik, lumpang dan alu, blender, magnetic stirrer, inkubator, hot plate, biosafety cabinet, rotary evaporator, autoklaf, oven, tabung reaksi, waterbath, gelas ukur, cawan petri, erlenmeyer, beaker glass, gelas objek, beban pemberat, pH meter, cork borer, pinset, jangka sorong digital, kertas saring (whatman), ayakan, lampu spiritus, rak tabung reaksi, jerigen, jarum ose, toples, wadah (pot salep), botol jar, batang pengaduk, porselen, vortex, spuit (jarum suntik), mikroskop, kulkas/freezer, corong laboratorium, penjepit tabung, spatula.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain tanaman cengkeh, bakteri *Streptococcus pyogenes*, bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, etanol 96%, aquadest, kertas cakram, PEG 400, PEG 4000, alfa tokoferol, phenoxyethanol, Mueller Hilton Agar (MHA), Nutrient Agar (NA) cutton bud, buffer pH, masker, sarung tangan (handscoon), alluminium foil, plastik wrap, gentian violet, safranin, lugol, minyak imersi, larutan Mc. Farland No. 0,5, Larutan NaCL 0,9%, chloramphenicol, dan salep bactoderm.

3.3. Sampel dan Populasi Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) yang diperoleh dari Kabupaten Deli Serdang Provinsi Sumatera Utara. Ekstrak cengkeh yang dibuat di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Hayati FMIPA Universitas Sumatera Utara. Biakan murni *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Sumatera Utara. Populasi penelitian ini adalah tanaman cengkeh bagian bunga.

3.4. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan uji metode difusi cakram dan difusi sumuran dengan beberapa konsentrasi dari ekstrak etanol cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dengan pemberian dosis 10%, 20%, 30% dengan kontrol positif chloramphenicol dan kontrol negatif aquadest. Kemudian dibuat formulasi salep ekstrak cengkeh dengan pemberian dosis yang efektif (10% dan 30%) yang dibuat sebanyak 3 kali pengulangan. Untuk kontrol negatif basis tanpa ekstrak cengkeh dan untuk kontrol positif menggunakan salep bactoderm.

3.5. Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini menggunakan metode observasi eksperimental. Pengamatan merupakan suatu metode pengumpulan data dengan melibatkan seluruh aspek yang sedang diselidiki secara langsung (Sugiono, 2016). Data yang diambil dalam melakukan penelitian ini adalah mengumpulkan data uji

skrining fitokimia dari ekstrak etanol cengkeh, mengumpulkan data uji evaluasi salep serta mengukur zona hambat dari ekstrak etanol cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan zona hambat dari salep ekstrak etanol cengkeh terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa* diukur dalam analisis ini.

3.6. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yaitu sebagai berikut

3.6.1. Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia cengkeh adalah tanaman yang diambil adalah bunga cengkeh yang diperoleh dari Kabupaten Deli Serdang Provinsi Sumatera Utara. Dipilih cengkeh yang baik dan berkualitas dan sudah kering. Sampel yang dikumpulkan berjumlah 1kg kemudian diayak untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Sampel yang telah kering dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk yang halus dan seragam. Hasilnya kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup (Nur Azizah & Samodra, 2022).

3.6.2. Pembuatan Ekstrak Etanol Cengkeh

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 1000 gram serbuk simplisia cengkeh dimasukkan ke dalam wadah, kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5000 mL. Ditutup dengan alumunium foil dan dibiarkan selama 5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari, sampel yang dimaserasi tersebut disaring menggunakan kertas saring, sehingga menghasilkan filtrat. Setelah itu filtrat dipisahkan menggunakan rotary evaporator dan dikentalkan menggunakan waterbath sehingga diperoleh ekstrak kental cengkeh. Setelah itu ekstrak ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup sebelum digunakan untuk pengujian (Lomboan *et al.*, 2021).

3.6.3. Uji Skrining Fitokimia

Adapun uji skrining fitokimia adalah sebagai berikut:

a. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 mL ekstrak cengkeh ditambahkan serbuk Mg dan 1 mL HCl. Terbentuknya warna merah, kuning atau warna jingga menunjukkan positif mengandung flavonoid.

b. Uji Saponin

Sebanyak 1 mL ekstrak cengkeh ditambahkan asam klorida kemudian dikocok kuat sampai timbul busa. Apabila busa stabil selama 10 menit, maka positif mengandung senyawa saponin.

c. Uji Alkaloid

Sebanyak 1 mL ekstrak cengkeh ditambahkan dengan 1 mL HCl 1% dan 1 mL pereaksi Mayer lalu dipanaskan ditangas air selama 1 menit, terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

d. Uji Tanin

Sebanyak 1 mL ekstrak cengkeh ditambahkan dengan 1 mL FeCl₃ 10%. Jika terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin.

e. Uji Fenol

Sebanyak 1 mL ekstrak cengkeh ditambah 1 mL larutan FeCl₃ 10% kemudian diamati. Terjadinya perubahan warna hijau atau kehitaman menunjukkan adanya fenol (S. Susanti *et al.*, 2023).

3.7. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan sebelum disterilisasi dicuci dan dikeringkan, lalu dibungkus dengan kertas koran. Untuk sterilisasi bahan dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan untuk sterilisasi alat menggunakan oven pada suhu 160-180°C selama 1 jam (Rahma & Nugraha, 2021).

3.8. Pembuatan Media

Media yang digunakan yaitu media MHA (Mueller Hinton Agar). MHA sebanyak 7 gram dilarutkan ke dalam 200 ml aquades, kemudian dipanaskan di atas hot plate. Pengadukan dilakukan dengan memasukkan magnetic stirrer ke dalam larutan. Selanjutnya, media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit. Media yang telah steril dituang ke dalam cawan petri dan tabung reaksi sesuai kebutuhan penelitian. Setelah memadat, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rahma & Nugraha, 2021).

3.9. Pewarnaan Gram *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Pewarnaan Gram bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok yakni, bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif serta warna gram dari bakteri yaitu merah dan biru. Prosedur kerja dari pewarnaan Gram ini yaitu bersihkan preparat glass dengan alkohol 70% kemudian di fiksasi di atas bunsen, beri label pada bagian bawah preparat glass, pijarkan jarum ose kemudian dicelupkan ke aquades dan teteskan 1 ose aquades pada preparat glass menggunakan jarum ose, pijarkan lagi jarum ose dan diambil bakteri dari media dengan cara aseptik lalu diratakan di atas preparat glass, keringkan teteskan larutan zat warna methylen blue sebanyak 1 atau 2 tetes keringkan selama 30 detik, cuci dengan aquades, keringkan preparat dengan dianginkan, kemudian teteskan 1 atau 2 tetes larutan lugol selama 1 menit kemudian bilas dengan alkohol 70% dan di cuci dengan aquades, terakhir tetes larutan Safranin sebanyak 1-2 tetes selama 30 detik kemudian bilas dengan aquades kembali dikeringkan dan diamkan, tetesi minyak imersi terakhir amati dibawah mikroskop. Parameter pengamatan selanjutnya yaitu pengamatan makroskopis dan mikroskopis koloni bakteri (Fitrah *et al.*, 2017).

3.10. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pertama bakteri uji di subkultur terlebih dahulu dengan cara diambil satu ose bakteri murni *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa* kemudian digoreskan merata secara sinambung pada media NA (Nutrient Agar), lalu dibungkus menggunakan plastik wrap dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Riskawati, 2010). Setelah di subkultur dibuat suspensi bakteri dengan cara diambil 1 ose bakteri dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9%, dengan biakan murni didalam tabung reaksi dan kocok menggunakan vortex sampai homogen, kemudian disamakan dengan standar Mc Farland (Misna & Diana, 2016).

3.11. Pembuatan Standar Kekeruhan Mc.Farland No 0,5

Standar kekeruhan Mc. Farland dibuat dengan melarutkan BaCl 1,175% sebanyak 0,5 ml dan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95ml. Campurkan kedua bahan tersebut lalu di vortex hingga homogen dan akan terlihat kekeruhan (Rahma & Nugraha, 2021).

3.12. Pembuatan Kontrol Positif

Pembuatan suspensi chloramphenicol ditimbang sebanyak 1 mg, kemudian dilarutkan di dalam 250 ml aquadest steril (Yoriska *et al.*, 2022).

3.13. Pembuatan Larutan Sampel

Ekstrak Etanol Cengkeh dari masing-masing konsentrasi ditimbang 0,10 gram untuk 10%, 0,20 gram untuk 20%, dan 0,30 gram untuk 30% yang kemudian dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1ml (Sirait *et al.*, 2014).

3.14. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji difusi dengan kertas cakram. Pengujian daya hambat ekstrak etanol cengkeh menggunakan metode difusi cakram. Disiapkan 5 buah cawan petri untuk kontrol positif, kontrol negatif, konsentrasi 10 %, konsentrasi 20% dan konsentrasi 30%. Kemudian untuk satu cawan petri berisi 3 ulangan yaitu U1, U2, U3, bagi dengan menggunakan spidol pada belakang cawan petri. Media MHA

yang sudah di autoklaf kemudian dituangkan ke dalam 5 buah cawan petri tunggu hingga media agar memadat. Setelah itu ambil 1 ml suspensi bakteri menggunakan mikropipet lalu di tambahkan dengan larutan NaCl 0,9% sampai kekeruhan sama dengan Mc.Farland. Setelah sudah mirip dengan Mc. Farland lalu di ambil 1ml dan digores di atas media padat MHA lalu di ratakan dengan cutton bud. Kertas cakram yang telah direndam selama 15 menit kedalam ekstrak etanol cengkeh pada konsentrasi 10%, 20% dan 30%. Kemudian tempelkan kertas cakram 6mm diatas permukaan media agar secara aseptis dengan jarak 3cm dan 2cm dari tepi media cakram. Kontrol positif yaitu chloramphenicol dan kontrol negatif aquadest. Media yang berisi bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam dan dilakukan pengamatan diameter zona hambat dengan mengukur menggunakan jangka sorong digital (Sirait *et al*, 2014).

3.15. Formula Salep Ekstrak Etanol Cengkeh

Pada penelitian digunakan ekstrak etanol cengkeh dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%. Setelah dilakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak terhadap bakteri maka dua konsentrasi yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar yang ditentukan sebagai 10% dan 30%, akan diubah menjadi konsentrasi salep ekstrak etanol cengkeh untuk menguji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri penyebab infeksi kulit.

Tabel 3.2. Formula Sediaan Salep Ekstrak Etanol cengkeh (EEC) (Nur Azizah & Samodra, 2022).

Bahan	Kegunaan	K(-)	K(+)	F1	F2
Ekstrak etanol cengkeh	Zat Aktif	0	0	10 gr	30 gr
Alfa tokoferol	Antioksidan	0,001 gr	0	0,001 gr	0,001 gr
Phenoxyethanol	Pengawet	0,02 gr	0	0,02 gr	0,02 gr
PEG 400	Basis salep	60 gr	0	54 gr	42 gr
PEG 4000	Basis salep	40 gr	0	36 gr	28 gr
Salep Bactoderm	Kontrol Positif	0	0,1 gr	0	0

Bahan salep yang akan digunakan adalah ekstrak etanol cengkeh yang dibuat formulasi salep dengan perbedaan konsentrasi yaitu 10%, dan 30%. Basis salep yang digunakan adalah PEG 400 dan PEG 4000. Masing-masing bahan yang dibutuhkan ditimbang sesuai dengan formulasi. PEG 4000 dilebur di atas penangas air dengan suhu 60°C, kemudian ditambahkan campuran PEG 400, phenoxyethanol dan alfa tokoferol diaduk sampai homogen. Ekstrak kental ditambahkan ke dalam mortir panas, kemudian ditambahkan basis yang sudah dilebur dan diaduk sampai homogen dan dimasukkan kedalam pot salep (Nur Azizah & Samodra, 2022).

3.16. Evaluasi Salep Ekstrak Etanol Cengkeh

Pengujian salep ekstrak etanol cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) terdapat beberapa parameter uji adalah sebagai berikut:

1. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan dengan mengamati sediaan salep dari bentuk, bau dan warna sediaan. Sediaan salep yang baik yaitu sediaan yang bentuknya setengah padat, berwarna seperti ekstrak dan berbau khas dari sampel (Rawung *et al.*, 2020).

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk melihat apakah sediaan yang telah dibuat homogen atau tidak. Caranya, salep dioleskan pada kaca transparan dimana sediaan diambil 3 bagian yaitu atas, tengah dan bawah. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar pada sediaan salep (Rinaldi *et al.*, 2022).

3. Uji pH

Uji pH dilakukan untuk melihat tingkat keasaman sediaan salep untuk menjamin sediaan salep tidak menyebabkan iritasi pada kulit. pH sediaan salep diukur dengan menggunakan stik pH indikator. Stik pH indikator dicelupkan ke dalam sampel salep yang telah diencerkan, diamkan beberapa saat dan hasilnya disesuaikan dengan standar pH indikator. pH sediaan yang memenuhi kriteria pH kulit yaitu dalam interval 4,5 – 6,5 (Rinaldi *et al.*, 2022).

4. Uji Daya Lekat

Pengujian daya lekat dilakukan dengan meletakkan sampel di atas dua gelas objek yang telah disediakan, kemudian ditekan dengan beban seberat 1 kg selama 5 (lima) menit. Setelah itu gelas objek dipasang menggunakan alat tes, alat tes kemudian diberi beban 80 gram dan dicatat waktu pelepasan salep dari gelas objek. Lama waktu yang diperlukan untuk memisahkan kedua kaca objek dicatat sebagai waktu lekat. Syarat sediaan salep yang baik adalah apabila daya lekat tidak lebih dari 4 detik (Susanti L, *et al.*, 2020).

5. Uji Daya Sebar

Sebanyak 0,5 gram sediaan salep diletakkan diatas kaca transparan yang berdiameter 15 cm, ditutup dengan kaca lainnya di atasnya dan dibiarkan selama \pm 1 menit. Setelah itu, ditambahkan beban tambahan seberat 150 gram dan didiamkan selama 1 menit lalu diukur diameter yang konstan (Rinaldi *et al.*, 2022). Daya sebar salep yang baik yaitu 5-7 cm (Cahyadi *et al.*, 2019).

6. Uji Iritasi

Uji iritasi terhadap kulit sukarelawan dilakukan dengan uji tempel terbuka (*open test*). Uji tempel terbuka dilakukan dengan mengoleskan sediaan pada lengan bawah, kemudian dibiarkan terbuka selama 5 menit, dan diamati reaksi yang terjadi. Reaksi iritasi positif ditandai oleh adanya kemerahan, gatal-gatal, atau bengkak pada kulit lengan bawah yang diberi perlakuan. Pengujian ini menggunakan responden sebanyak 15 orang (A. Sari & Maulidya, 2017).

3.17. Uji Aktivitas Antibakteri Salep Ekstrak Etanol Cengkeh

Pengujian antibakteri sediaan salep ekstrak etanol cengkeh menggunakan metode sumuran. Sediaan salep yang akan diuji dalam berbagai perbandingan yaitu 10% dan 30%. Kontrol positif menggunakan salep bactoderm dan kontrol negatif menggunakan basis PEG 4000 dan PEG 400 tanpa ekstrak cengkeh. Masing-masing ditimbang sebanyak 0,1 gram, kemudian dimasukkan ke dalam lubang sumuran cawan petri. Setiap cawan berisi 3 lubang sumuran dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pada masing-masing formula yaitu (kontrol negatif, kontrol positif, 10%, 30%). Diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan setelah 1x24 jam masa inkubasi. Diameter zona hambat

yang terbentuk diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong digital (Rawung *et al.*, 2020).

3.18. Analisis Data

Hasil pengamatan diameter zona hambat ekstrak etanol cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dalam menghambat pertumbuhan bakteri penyebab infeksi kulit (*Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa*) disajikan secara deksriptif kualitatif dengan menggunakan tabel hasil pengamatan Davis and Stout.



UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
SUMATERA UTARA MEDAN