

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli sampai Agustus 2024 dan dilaksanakan di beberapa lokasi yang berbeda yaitu :

1. Identifikasi tanaman sirih hijau (*Piper betle* L.) di Laboratorium Herbarium Medanense, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara. Padang Bulan, Kecamatan Medan Baru, Kota Medan, Sumatera Utara; Jl. Bioteknologi No. 1.
2. Pembuatan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) pada Laboratorium Farmasi Medanense FMIPA Universitas Sumatera Utara. Jl. Bioteknologi No.1, Padang Bulan, Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera utara.
3. Pembuatan salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan uji daya hambat antifungi terhadap *Candida albicans* dan *Malassezia fur fur* secara *In-Vitro* pada Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara Jl. Lap. Golf, Tuntungan.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : blender, tabung reaksi beserta rak, gelas beaker, erlenmeyer, timbangan analitik, *rotary evaporator*, cawan petri, oven, jarum ose, *hot plate*, *magnetic stirrer*, inkubasi, *autoclave*, *waterbath*, kapas steril, pinset, kertas cakram, bunsen, pipet tetes, mikropipet, spatula, jangka sorong, gelas ukur, pisau, gunting, lemari es, *mortir* dan *stamper*, *cup slime*, dan pH meter.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : daun sirih (*Piper betle* L.), biakan murni jamur *Candida albicans* dan *Malassezia fur fur*, Media *Potato Dextrose*

Agar (PDA), aquades steril, *Dimethyl Sulfo Oxid* (DMSO) 10%, antibiotik *Flukonazole*, vaslin album, cera alba, dan propilen glikol, alumunium foil, warp plastic, kertas label, tissue, salep daktarin.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel daun sirih (*Piper betle* L.) yang masih segar diambil sebanyak 10 kg dari lokasi Tanjung Morawa, JL Pendidikan (Gapen) Samping Kim Star No 332, Kecamatan Tanjung Morawa, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara. Biakan murni jamur *Candida albicans* dan *Malassezia fur fur* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sumatera Utara.

3.4 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental kuantitatif. Teknik ini digunakan karena pengujian dilaksanakan secara eksperimental berbasis laboratorium. Tujuan dari teknik ini adalah untuk memastikan apakah salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) mempengaruhi perkembangan *Malassezia fur fur* dan *Candida albicans*.

3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan dua metode yaitu difusi *Kirby Bauwer* dan sumuran. Pada uji aktivitas ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) menggunakan metode difusi *Kirby Bauwer* (difusi cakram) dengan kontrol positif yang di pakai yaitu antibiotik *Flukonazole*, kontrol negatif yaitu cakram kosong ditetesi larutan DMSO 10% dan perlakuan memakai beberapa konsentrasi yaitu 15%, 20%, 25%, 50%. Sejumlah konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang mempunyai daya hambat kuat akan digunakan untuk membuat formula salep, dan akan dilakukan uji daya hambat. Sementara itu, formula salep ekstrak daun sirih diuji menggunakan metode sumuran dengan kontrol positif, yaitu salep *Daktarin*, dan kontrol negatif, yaitu sediaan salep tanpa penambahan ekstrak.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Identifikasi Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

Identifikasi Tanaman bertujuan untuk mengetahui secara ilmiah, keragaman tanaman dengan keunggulan atau karakteristik tertentu dapat dijelaskan dengan berbagai metode untuk mengidentifikasi tanaman obat. Sifat dan ciri tanaman tersebut, serta morfologi akar, batang, daun, bunga, buah, dan bijinya, serta keunggulan dan aplikasinya, semuanya dapat diteliti menggunakan pendekatan deskriptif (Harahap *et al.*, 2022).

3.6.2 Sterilisasi Alat

Autoklaf yang beroperasi dengan uap air digunakan untuk melakukan prosedur sterilisasi basah, metode ini digunakan untuk sterilisasi media, cairan dan peralatan laboratorium dengan suhu 121°C hingga 15 menit tekanan 2 atm. Sedangkan sterilisasi kering menggunakan oven dengan suhu 180°C hingga 2 jam yang bertujuan untuk mensterilkan alat-alat seperti cawan petri, tabung reaksi, labu erlenmeyer yang di bungkus dengan kertas. Serta alat logam disterilkan menggunakan cara dipijarkan pada Bunsen (Wulandari *et al.*, 2021).

3.6.3 Ekstraksi Daun Sirih Hijau

1. Pembuatan Simplisia

Dicuci daun sirih segar dengan menggunakan air untuk menghilangkan kotoran yang melekat di daun, ditiriskan diatas papan. Ditimbang daun sirih sebagai berat basah. Dikeringkan daun sirih yang sudah ditimbang menggunakan sinar matahari dengan ditutup menggunakan kain hitam dan menggunakan oven dengan suhu 40-50°C sampai simplisia kering.

2. Pembuatan Serbuk Kering

Daun sirih yang sudah kering dihancurkan dengan cara ditumbuk dan diblender.

3. Pembuatan Ekstrak

Dalam penelitian ini, etanol 96% digunakan sebagai pelarut dalam produksi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.). Teknik maserasi digunakan untuk melakukan

ekstraksi. Metode maserasi digunakan untuk mengekstrak 1000 gram serbuk simplisia. Ekstrak dimaserasi selama tiga kali 24 jam, dengan batang pengaduk digunakan setiap enam jam. Rasio 1:10 digunakan untuk membandingkan simplisia dan pelarut etanol 96%. Rotary evaporator digunakan untuk memekatkan ekstrak maserasi pada suhu 60°C, menghasilkan ekstrak (Shelin *et al.*, 2023).

3.6.4 Uji Standarisasi Nonspesifik Simplisia

1. Penetapan kadar Abu Total

Timbang satu hingga dua gram serbuk simplisia daun sirih hijau, kemudian masukkan dua hingga tiga gram serbuk yang telah dihaluskan dan ditimbang ke dalam wadah tertutup yang telah dilapisi ter dan dipanaskan pada suhu tertentu selama setengah jam. Untuk membuat wadah setebal 5 hingga 10 mm, goyangkan wadah hingga rata. Buka wadah, masukkan ke dalam oven atau ruang pengering, dan biarkan kering pada suhu tertentu hingga beratnya tetap sama. Lalu dilakukan replikasi sebanyak lima kali. Perhitungan kadar abu total sesuai dengan persamaan (Jayani. 2018).

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{berat abu sisa pijar}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

2. Penetapan kadar Abu Yang Tidak Larut Asam

Setelah menentukan komposisi abu, abu dipanaskan selama lima menit dalam 25 mililiter asam klorida encer P. Setelah lima menit, bagian yang tidak larut dibuang dan disaring melalui kertas saring yang bebas dari abu, dicuci dengan air panas dan lima belas menit hingga bobot tetap. Lalu dilakukan replikasi sebanyak lima kali. Perhitungan tentang kadar abu total dapat dilihat pada persamaan (Jayani. 2018).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu sisa pijar}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

3. Penetapan Kadar Sari Larut dalam Air

Timbang lima gram serbuk simplisia daun sirih hijau kering, rendam dengan seratus mililiter air kloroform P selama dua puluh empat jam, kocok kuat-kuat selama

enam jam pertama, lalu biarkan selama delapan belas jam. Labu ukur 100,0 ml disaring secara efisien setelah 18 jam. Setelah penyaringan, filtrat diambil sebanyak 20,0 ml menggunakan pipet volume dan dikeringkan dalam plat dangkal dengan cara menguapkannya. Sampai beratnya tidak berubah, filtrat dipanaskan hingga diam pada suhu 1050C. Kemudian dilakukan lima kali replikasi. Rumus untuk jumlah ekstrak yang larut dalam air ditunjukkan dalam persamaan (Jayani. 2018).

$$\text{Kadar sari larut dalam air} = \frac{\text{berat ekstrak} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

4. Penetapan Kadar Sari Larut dalam Etanol

Labu bersumbat yang berisi 5,0 g serbuk daun sirih kering dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 95% setelah ditimbang. Setelah dikocok sebentar-sebentar selama enam jam pertama, labu didiamkan selama delapan belas jam. Dalam labu ukur 100 ml, serbuk disaring secara efisien setelah 18 jam. Setelah penyaringan, 20,0 mililiter filtrat dikumpulkan menggunakan pipet volume dan dikeringkan dalam cawan dangkal dengan cara menguapkannya. Dipanaskan hingga 1050C selama istirahat hingga beratnya tidak berubah. Lalu dilakukan replikasi sebanyak lima kali. Persamaan untuk menghitung kadar sari larut etanol dapat dilihat pada persamaan (Jayani. 2018).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{berat ekstrak} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI

3.6.5 Uji Skrining Fitokimia

1. Uji Flavonoid

Tabung reaksi diisi dengan 0,1 g ekstrak, 0,5 mg bubuk magnesium, dan tiga tetes HCl pekat. Flavonoid positif ditunjukkan dengan warna kuning, kecokelatan, hijau, hitam, dan jingga (Kursia *et al.*, 2016).

2. Uji Saponin

Tabung reaksi diisi dengan 0,1 g ekstrak, 10 mL air hangat atau panas, dan diaduk selama setengah jam. Jumlah busa yang terbentuk diukur dengan mengamatinya. Jika buih tidak hilang setelah lima menit, HCl 2N digunakan. Hasil yang berhasil ditunjukkan jika busa tetap konsisten (Kursia *et al.*, 2016).

3. Uji Alkaloid

Tabung reaksi yang berisi 0,1 g ekstrak diaduk sebelum 2 mL amonia dan 2 mL kloroform ditambahkan, diikuti dengan HCl 2N. Tiga bagian larutan yang dihasilkan ditempatkan dalam tabung reaksi, dan reagen Dragendorf, Mayer, dan Wagner ditambahkan ke setiap tabung reaksi. Dalam reagen Wagner, presipitasi cokelat menghasilkan temuan yang baik; dalam reagen Mayer, presipitasi putih menunjukkan senyawa alkaloid positif; dan dalam reagen Dragendorf, presipitasi merah/oranye menunjukkan senyawa alkaloid positif (Kursia *et al.*, 2016).

4. Uji Tanin

Jika tiga tetes FeCl₃ 5% diteteskan ke dalam 0,1 g ekstrak dalam tabung reaksi, ekstrak akan berubah menjadi biru, yang menunjukkan adanya tanin. Atau, tambahkan 10 mililiter larutan KOH ke dalam 0,5 gram ekstrak (Kursia *et al.*, 2016).

3.6.6 Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Labu Erlenmeyer yang berisi 39 g medium PDA diisi dengan 1000 ml air suling dan dibiarkan larut. Setelah itu dipanaskan hingga mendidih dan merata, dan setelah mendidih, dibiarkan hingga suhu lingkungan medium turun menjadi 36–37 °C. Setelah itu, medium disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 derajat Celsius dan tekanan 2 atm untuk mensanitasinya. Setelah disterilkan, medium dikeluarkan dari autoklaf dan dipanaskan hingga suhu 45–50 derajat Celsius. Dua puluh mililiter medium PDA ditambahkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan mengeras (Jamilatun *et al.*, 2020).

3.6.7 Peremajaan Jamur *Candida albicans* dan *Malassezia fur fur*

Diambil inokulum jamur *Candida albicans* dan *Malassezia fur fur* masing –

masing sebanyak 1 ose secara aseptik ke dalam media PDA. Inokulasi dalam cawan petri dilakukan dengan metode gores. Kemudian inkubasi selama 3-5 hari dengan suhu 37°C (Rodiah et al., 2022).

3.6.8 Pembuatan standar kekeruhan Mc Farland 0,5

Pembuatan satu tabung reaksi merupakan langkah awal dalam pembuatan baku kekeruhan Mc Farland 0,5. Selain itu, terdapat 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dan 0,05 ml larutan BaCl 1%. Setelah itu, larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan dalam membuat suspensi *Candida albicans* dan *Malassezia fur fur*. dengan menyiapkan 2 tabung reaksi. Setelah setiap koloni rambut, sembilan mililiter larutan NaCl 0,85% dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diaduk rata *Candida albicans* dan *Malassezia* disingkirkan menggunakan loop pendingin pijar. Standarisasi kekeruhan Mc Farland sebesar 0,5 kemudian digunakan sebagai pembanding. Tambahkan NaCl 0,85% jika terlalu keruh hingga jumlah kekeruhan sesuai dengan kekeruhan Mc Farland sebesar 0,5 (Damayanti. 2022).

3.6.9 Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirih Hijau Terhadap Jamur *Candida albicans* dan *Malassezia fur fur*

Pada pengujian aktivitas ekstrak daun sirih terhadap jamur *Candida albicans* dan jamur *Malassezia fur* digunakan metode cakram yaitu metode pengukuran zona kertas cakram yang digunakan untuk mengukur aktivitas antibakteri memiliki zona bening di sekelilingnya. Metode difusi cakram dipilih karena manfaatnya, yang meliputi kemampuannya untuk digunakan pada molekul nonpolar serta kecepatan, kemudahan penggunaan, dan kesederhanaannya.

1. *Candida albicans*

Preparat *Candida albicans* dioleskan ke permukaan media padat PDA dengan cara digores berulang kali menggunakan *cotton bud*. Kertas cakram berisi ekstrak daun sirih hijau yang didifusikan pada konsentrasi 15%, 20%, 25%, dan 50% diletakkan dan kontrol negatif memakai kertas cakram yang ditetesi larutan DMSO 10% serta kontrol positif dengan antibiotik Flukonazole. Disimpan dalam inkubator selama 48 jam.

Setelah diinkubasi, diamati sekeliling kertas cakram pada masing-masing konsentrasi kemudian di ukur zona hambat yang diukur (Komala *et al.*, 2019).

2. *Malassezia fur fur*

Preparat *Malassezia fur fur* dioleskan ke permukaan media padat PDA dengan cara digores berulang kali menggunakan *cotton bud*. Kertas cakram berisi ekstrak daun sirih hijau yang didifusikan pada konsentrasi 15%, 20%, 25%, dan 50% diletakkan dan kontrol negatif memakai kertas cakram yang ditetesi larutan DMSO 10% serta kontrol positif dengan antibiotik Flukonazole. Disimpan dalam inkubator selama 48 jam. Setelah diinkubasi, diamati sekeliling kertas cakram pada masing-masing konsentrasi kemudian di ukur zona hambat yang diukur (Komala *et al.*, 2019).

3.7 Formulasi

Tabel 3.2 Formulasi Salep Ekstrak Daun Sirih hijau Berdasarkan Farmakope Indonesia Edisi VI 2020

Komposisi	Formula		Fungsi
	FI	FII	
Ekstrak daun sirih hijau	25%	50%	Zat aktif
Vaslin album	86,9 g	86,9 g	Basis salep
Cera alba	8 g	8 g	Basis salep
Propilen Glikol	0,1 g	0,1 g	Pengawet
Berat Total	100 g	100 g	

Sumber : Kawarnidi *et al.*, 2022

Ket : (+) = Salep Daktari

(-) = Salep tanpa penambahan ekstrak

Basis hidrokarbon dari salep yang akan dibuat akan menempel pada kulit untuk jangka waktu lama, mencegah keluarnya uap air ke udara, dan sulit dihilangkan.

Formulasi sediaan salep dibuat pada masing-masing konsentrasi. Bahan yang akan digunakan ditimbang seperti yang telah dirancang. Cera alba dimasukkan ke dalam cawan petri dan dileburkan diatas hotplate dan diaduk. Cera alba yang sudah dicairkan dan Vaseline album dicampur secara bersamaan. Setelah semua bahan tercampur, tambahkan ekstrak kental dan aduk hingga merata.

3.8 Pemeriksaan Sifat Fisik Salep

3.8.1 Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan dengan cara memeriksa bentuk, warna, dan bau sediaan salep. Kementerian Kesehatan RI menyatakan bahwa salep harus memenuhi persyaratan tertentu, antara lain berbentuk setengah padat, berwarna sesuai dengan kriteria pada saat pertama kali dibuat, dan tidak berbau busuk.

3.8.2 Uji pH

Larutan penyangga pH 7 harus digunakan untuk mengkalibrasi pH meter. Air suling digunakan untuk mengencerkan 1 g produk yang akan dianalisis, atau hingga 10 ml. Pengukuran pH pada jarum dicatat saat elektroda pH meter dicelupkan ke dalam larutan yang diuji dan jarum dibiarkan bergerak hingga mencapai posisi tetap. Kisaran pH ideal untuk salep adalah antara 4,5 - 6,5, yang sama dengan pH kulit manusia (Lasut *et al.*, 2019).

3.8.3 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas sediaan salep dilakukan dengan cara mengoleskan salep pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang harus menunjukkan susunan yang seragam. Ketika formulasi salep diterapkan, salep homogen ditandai dengan tidak adanya gumpalan atau butiran (Badia *et al.*, 2022).

3.8.4 Uji Daya Sebar

Satu gelas diletakkan di atas salep 0,5 g, dan campuran dидiamkan selama satu menit. Diameter konstan kemudian diukur setelah menambahkan 100 g beban dan menunggu selama satu menit. Daya sebar salep yang baik memiliki diameter 5-7 cm (Badia. 2022).

3.9 Uji Aktivitas Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau Terhadap Jamur *Candida albicans* dan *Malassezia fur fur*

Keunggulan metode difusi sumuran adalah isolat aktif di bagian bawah agar nutrisi maupun bagian atas, maka lebih mudah memperkirakan luas zona hambat yang terbentuk. Kemampuan salep ekstrak daun sirih dalam melawan *Candida albicans* dan *Malassezia fur fur* diuji menggunakan teknik sumuran. Dengan membuat lubang tegak lurus terhadap agar padat yang telah terinfeksi jamur uji, teknik sumuran dilakukan. Jumlah dan penempatan lubang kemudian dimodifikasi sesuai dengan tujuan penelitian.

1. *Candida albicans*

Diambil 0,5 ml inokulasi suspensi *Candida albicans* di inokulasikan ke dalam cawan petri yang sudah steril dan di ratakan dengan swab steril agar suspensi tercampur secara merata kemudian di tuang media PDA kedalam cawan petri yang sudah ada suspensi *Candida albicans*. Dibuat lubang pada media PDA dengan diameter 6 mm menggunakan *cork borer* atau pelubang gabus yang telah di sterilkan. Pada lubang di isi salep yang akan diujikan beserta kontrol positif dan negatif. Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dan di ukur zona bening yang terbentuk (Saputri *et al.*, 2021).

2. *Malassezia fur fur*

Diambil 0,5 ml inokulasi suspensi *Malassezia fur fur* di inokulasikan ke dalam cawan petri yang sudah steril dan di ratakan dengan swab steril agar suspensi tercampur secara merata kemudian di tuang media PDA kedalam cawan petri yang sudah ada suspensi *Malassezia fur fur*. Dibuat lubang pada media PDA dengan diameter 6 mm menggunakan *cork borer* atau pelubang gabus yang telah di sterilkan. Pada lubang di isi salep yang akan diujikan beserta kontrol positif dan negatif. Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dan di ukur zona bening yang terbentuk (Saputri *et al.*, 2021).

3.10 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Parameter uji yang diamati adalah dengan menggunakan penggaris atau jangka sorong, ukurlah zona inhibisi (mm) dari setiap perlakuan ekstrak daun sirih hijau, perhatikan seberapa jauh zona inhibisi tersebut dari kertas cakram dan sumuran. Zona penghambatan yang terbentuk di sekitar kertas cakram dapat diperiksa dengan mengukur diameternya pada arah horizontal dan vertikal. Semakin besar zona penghambatan (zona terang), semakin efektif ekstrak daun sirih dalam menghentikan perkembangan jamur. Diameter rata-rata zona penghambatan dihitung dengan memasukkan kedua diameter tersebut ke dalam perhitungan (Rodiah. 2022).

$$\text{rumus : } \frac{(D_v - D_s) + (D_h - D_s)}{2} \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan :

D_v = Diameter Vertikal

D_h = Diameter Horizontal

D_s = Diameter Cakram/Sumuran

2 = Jumlah pengukuran

Greenwood (1995) menyatakan bahwa respon terhadap penghambatan pertumbuhan mikroba dapat dibagi menjadi empat kategori: jika diameter akhir lebih dari 20 mm, dianggap kuat; jika antara 16 dan 20 mm, dianggap sedang; jika antara 10 dan 15 mm, dianggap lemah; dan jika kurang dari 10 mm, dianggap kurang efektif.