

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu Dan Tempat Penelitian

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

1. Identifikasi tanaman sirih (*Piper betle* L.) di Laboratorium Herbarium Medanense FMIPA Universitas Sumatera Utara. Jl. Bioteknologi No.1, Padang Bulan, Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera utara.
2. Pembuatan ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) Dan uji skrining fitokimia di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Universitas Sumatera Utara. Jl. Bioteknologi No.1, Padang Bulan, Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera utara.
3. Pengujian karakteristik simplisia daun sirih (*Piper Betle* L.) di Laboratorium Pengembangan PTKI Medan. Jl Jln. Medan Tenggara VII Medan 20228. Politeknik Teknologi Kimia Industri.
4. Pembuatan *hair tonic* ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dan uji daya hambat antifungi terhadap *Pityrosporum ovale* dan *Microsporum canis* secara *in-vitro* di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara Jl. Lap. Golf, Medan Tuntungan.
5. Pengujian Viskositas *hair tonic* ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) di Laboratorium Politeknik Teknologi Kimia Industri Medan. Jln. Medan Tenggara VII, Medan 20228.

3.2 Alat Dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain blender(miyako), waterbath, hote plate, cawan petri, bunsen, jarum ose, erlenmeyer (pyrex), spatula, evaporator, autoclave, inkubator (Mammert), tabung reaksi (pyrex), rak tabung reaksi, jangka sorong, autoclaf, timbangan analitik, lemari pendingin, viskometer brookfield, pinset, pH meter(pHep), kain hitam, batang pengaduk, mortal dan alu, objek glass (sail brand), beaker glass (pyrex) dan botol *hair tonic*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain jamur *Pityrosporum ovale* dan *Microsporum canis*, ekstrak daun sirih, etanol 96%, alkohol 70%, aluminium foil, plastik wrap, DMSO 10%, aquadest, propilen glikol, asam askorbat, phenoxyethanol, mentol, *cutton bud*, *hair tonic* mustika ratu, flukonazole, kertas saring, kertas cakram, media Potato Dextrose Agar (PDA).

3.3 Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental kuantitatif. Teknik ini digunakan karena dilaksanakan pengujian eksperimental berbasis laboratorium. Eksperimental ini dilakukan untuk melihat apakah sediaan *hair tonic* herbal ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) mampu menghambat jamur *Pityrosporum ovale* dan *Microsporum canis*.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*. Pada pengujian aktivitas ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) menggunakan kertas cakram dengan kontrol positif antibiotik flukonazole, kontrol negatif menggunakan cakram kosong ditetesi larutan DMSO 10% dan perlakuan memakai beberapa konsentrasi yaitu 15%, 20%, 25% dan 30%. Dan pengujian sediaan *hair tonic* herbal ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) menggunakan kertas cakram dengan kontrol positif yaitu *hair tonic* mustika ratu, kontrol negatif menggunakan cakram kosong ditetesi *hair tonic* tanpa ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dan perlakuan ditentukan dari pengujian beberapa konsentrasi ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) yang memiliki daya zona hambat yang kuat. Kemudian, konsentrasi inilah yang akan digunakan untuk pembuatan *hair tonic* herbal dan dilakukan uji zona hambat *hair tonic* herbal terhadap jamur *Pityrosporum ovale* dan *Microsporum canis*

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi ini dilakukan di Laboratorium Herbarium Medanense FMIPA Universitas Sumatera Utara. Bahan yang dideterminasi adalah tumbuhan sirih hijau. Kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti dapat dicegah jika hasil

penentuan menunjukkan bahwa sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian ini memang benar daun sirih hijau (*Piper betle* L.) (Sani *et al.*, 2023).

3.5.2 Sterilisasi Alat

Peralatan yang diperlukan dibersihkan dan dikeringkan. Cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, dan tabung reaksi merupakan peralatan tahan panas yang perlu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 atm selama 15 menit. Sebaliknya, alkohol 70% disemprotkan pada instrumen yang tidak tahan panas. Instrumen logam seperti pinset dan jarum ose diapungkan di atas api bunsen (Nabila *et al.*, 2021).

3.5.3 Ekstrak Daun Sirih

1. Pembuatan Simplisia

Daun sirih yang telah dikumpulkan kemudian dicuci dengan air mengalir, ditiriskan, kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil. Dikeringkan di dalam ruangan atau di bawah sinar matahari dengan kain hitam sebagai penutup sampai benar-benar kering berguna melindungi kandungan metabolit sekunder daun sirih dari radiasi sinar UV dilakukan. Sampel yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan blender.

2. Pembuatan Ekstrak Daun Sirih

Proses pembuatan ekstrak daun sirih hijau dalam penelitian ini menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan teknik maserasi. Serbuk simplisia seberat 1000 gr diekstraksi dengan metode maserasi, maserasi ekstrak selama 3×24 jam sambil diaduk tiap 6 jam dengan batang pengaduk, perbandingan antara simplisia dan pelarut etanol 96% menggunakan perbandingan (1:10). Ekstrak maserasi dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C yang menghasilkan ekstrak. Dilanjutkan dengan penggunaan waterbath pada suhu 50°C selama 3 hari untuk menguapkan sisa pelarut hingga didapat ekstrak kental (Shelin *et al.*, 2023).

3.6 Uji Skrining Fitokimia

3.6.1 Uji Kandungan Flavonoid

0,1 gram ekstrak daun sirih ditambah dengan pelarut metanol, dipanaskan. Filtrat kemudian ditambahkan dengan 1 ml H₂SO₄. Warna merah yang terbentuk menunjukkan senyawa flavonoid (Hasma,2024).

3.6.2 Uji Kandungan Saponin

0,1 gram ekstrak daun sirih ditambah dengan pelarut etanol, lalu ditutup dan dikocok selama kurang lebih 10 detik hingga muncul busa. Selanjutnya ditambahkan HCl 2N sebanyak 1 tetes melalui dinding tabung, jika busa stabil, sampel mengandung saponin (Shelin *et al.*, 2023).

3.6.3 Uji Kandungan Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan reagen wagner. Ekstrak dimasukan ke tabung dan ditambahkan n-heksan. Kemudian ditambahkan 0,5 mL HCl 2N, dikocok hingga homogen. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes reagen Wagner ke dalam tabung. jika terbentuk endapan coklat pada tabung maka sampel tersebut mengandung alkaloid (Shelin *et al.*, 2023)

3.6.4 Uji Kandungan Tanin

Sebanyak 2 ml sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan metanol, diocok hingga homogen. Ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 10%. Apabila terbentuk warna hitam menunjukkan adanya senyawa tanin (Shelin *et al.*, 2023)

3.6.5 Uji Kandungan Terpenoid/Steroid

Pengujian terpenoid dan steroid, masukkan 2 ml ekstrak ke dalam tabung reaksi tambahkan 10 tetes H₂SO₄ reaksi positif terpenoid adanya warna hijau dan biru. Reaksi positif steroid adanya warna kuning (Liha, 2023).

3.7 Uji Karakteristik Simplisia Daun Sirih (*Piper betle L.*)

3.7.1 Uji Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gram ekstrak kering ditimbang, dimasukkan kedalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan,

tambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat kedalam krus, uapkan setelah itu pijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang, kemudian dihitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Rivai, 2014).

3.7.2 Uji Kadar Abu Yang Tidak Larut Asam

Disiapkan abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam. saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Rivai, 2014).

3.7.3 Uji Kadar Sari Larut Etanol

Setelah simplisia dimasukan kebotol lalu ditambah pelarut etanol 96% sebanyak 100 ml lalu di maserasi selama 24 jam dan diaduk/dikocok setiap 6 jam, kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah di maserasi kemuadian sebanyak 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan porselin menggunakan oven dengan suhu 105°C sehingga mendapatkan bobot konstan, dihitung bobot ekstrak setiap 5 menit, dihitung kadar persen pada ekstrak (Muslihin, 2022).

3.7.4 Uji Kadar Sari Larut Air

Dimasukkan simplisia kebotol lalu ditambah pelarut kloroform sebanyak 2,5 ml dan aquadest sebanyak 97,5 ml lalu di maserasi selama 24 jam dan diaduk/dikocok setiap 6 jam, kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah dimaserasi kemuadian sebanyak 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan porselin menggunakan oven dengan suhu 105°C sehingga mendapatkan bobot konstan, dihitung bobot ekstrak setiap 5 menit, dihitung kadar persen pada ekstrak. Setelah ekstrak cair diuapkan sampai mencapai bobot konstan dan membentuk ekstrak kental. Ekstrak kental diletakkan kedalam cawan porselin dan ditimbang bobot akhir ekstrak, cawan porselin ditutup menggunakan aluminium foil agar mencegah dari pertumbuhan mikroorganisme dan diletakan kedalam desikator agar mencegah dari kelembapan (Muslihin, 2022).

3.8 Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)

PDA ditimbang sebanyak 39 gram, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril dan ditambahkan 1000 ml aquades. Media PDA kemudian dipanaskan di atas hot plate hingga larut sempurna. Setelah media PDA larut, lalu ditutup dengan menggunakan aluminium foil, dan direkatkan dengan plastik wrap. Kemudian media PDA dimasukkan ke dalam autoclave untuk disterilkan pada suhu 121°C pada tekanan 1-2 atm selama kurang lebih 15 menit. Kemudian media dikeluarkan dari autoclave proses sterilisasi selesai. Media kemudian dipanaskan hingga suhu 45°C hingga 50°C. Setelah itu media PDA dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 15-20 mL dan dibiarkan memadat (Siahaan & Mullo, 2021).

3.9 Peremajaan Jamur Uji

Peremajaan isolat jamur *Pityrosporium ovale* dan *Microsporium canis* dilakukan pada cawan petri dengan mengambil sebagian hifa jamur yang sebelumnya ditumbuhkan dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) pada cawan petri. kemudian dilakukan inokulasi pada media PDA steril dalam tabung reaksi dengan menggunakan metode gores. Setelah diinokulasi, jamur diinkubasi pada suhu ruang (25-27°C) selama 2 hari sampai miselia jamur menjadi banyak (Halmwiyah *et al.*, 2019).

3.10 Pembuatan Standar Kekeruhan (*Mc. Farland 0,5*)

Pembuatan standar kekeruhan *Mac Farland 0.5*, terlebih dahulu dilakukan pencampuran H₂SO₄ 1% dengan konsentrasi 9,95 ml, kemudian tambahkan BaCl₂ dan 2H₂O 1% sebanyak 0,05 ml kedalam tabung reaksi, kemudian dihomogenkan hingga terlihat keruh. Kekeruhan dari larutan *Mc. Farland 0,5* digunakan sebagai standar kekeruhan suspensi jamur (Shelin *et al.*, 2023).

3.11 Pembuatan Antibiotik

Digerus 1 tablet Flukonazole lalu timbang serbuk sebanyak 50gr dilarutkan dengan 5 ml aquades (T, 2019).

3.12 Pembuatan Larutan Konsentrasi

Ekstrak daun sirih ditimbang dengan timbangan analitik, masing-masing ditimbang sebanyak 0,75gr, 1gr, 1,25gr dan 1,5gr . Kemudian masing masing

dilarutkan dengan 5ml Aquades, sehingga didapatkan konsentrasi 15%; 20%; 25% dan 30% dan diberi label sesuai konsentrasinya (Rosa,2021).

3.13 Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Daun Sirih (*Piper batle L.*)

Metode difusi cakram yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antijamur ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) menghasilkan zona hambat atau zona bening di sekeliling kertas cakram yang telah ditetesi ekstrak daun sirih hijau sesuai dengan konsentrasi yang terbentuk. Derajat penghambatan antijamur kemudian dinilai dengan mengukur diameter zona hambat tersebut dengan jangka sorong.

1. *Pityrosporum ovale*

Dengan menggunakan *cotton bud*, suspensi jamur *Pityrosporum ovale* dipindahkan ke dalam cawan petri steril yang telah diisi dengan media PDA padat yang telah disiapkan sebelumnya. Setelah kertas cakram steril direndam dalam ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) 15%, 20%, 25%, dan 30% selama 15 menit agar dapat terserap, kertas cakram tersebut diletakkan di atas media PDA. Flukonazole berfungsi sebagai kontrol positif, sedangkan DMSO 10% berfungsi sebagai kontrol negatif. Untuk memastikan kertas cakram melekat sepenuhnya pada setiap media kultur, kertas cakram ditekan dengan hati-hati. Untuk mencegah uap jatuh ke media kultur dari penutup cawan petri media kultur dibalik. Inkubasi 37°C selama 2x24 jam (Rodiah et al., 2022)

2. *Microsporum canis*

Dengan menggunakan *cotton bud*, suspensi jamur *Microsporum canis* dipindahkan ke dalam cawan petri steril yang telah diisi dengan media PDA padat yang telah disiapkan sebelumnya. Setelah kertas cakram steril direndam dalam ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) 15%, 20%, 25%, dan 30% selama 15 menit agar dapat terserap, kertas cakram tersebut diletakkan di atas media PDA. Flukonazole berfungsi sebagai kontrol positif, sedangkan DMSO 10% berfungsi sebagai kontrol negatif. Untuk memastikan kertas cakram melekat sepenuhnya pada setiap media kultur, kertas cakram ditekan dengan hati-hati sebelumnya. Untuk mencegah uap jatuh ke media kultur dari penutup cawan petri, media kultur dibalik. Inkubasi 37°C selama 3x24 jam (Rodiah et al., 2022).

3.14 Formulasi Hair Tonic Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L.*)

Bahan yang digunakan dalam pembuatan hair tonic sesuai dengan SNI 16-4955-1998. Sediaan *hair tonic* dibuat sebanyak Add 100ml dengan variasi konsentrasi ekstrak pada formula sediaan *hair tonic* ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*).

Tabel 3.1 Formulasi sediaan *hair tonic* (Hasma, 2023)

Bahan	Konsentrasi				Kegunaan
	F0	F1	F2	F3	
Ekstrak daun sirih	-	20 gr	25 gr	30 gr	Bahan aktif
Etanol 96%	25ml	25ml	25ml	25ml	Penstabil
Propylene glycol	15ml	15ml	15ml	15ml	Humektan
Asam askorbat	0,1gr	0,1gr	0,1gr	0,1gr	Vit C
Phenoxyethanol	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml	Pengawet
Mentol	0,1gr	0,1gr	0,1gr	0,1gr	Pendingin
Aquades	Add 100ml	Add 100ml	Add 100ml	Add 100ml	Pelarut

Keterangan :

K+ : *Hair tonic* mustika ratu

Pembuatan Sediaan *Hair Tonic*

Bahan ditimbang berdasarkan formula yang digunakan. Ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) dan Phenoxyethanol 0,1 ml masing-masing dilarutkan dengan etanol 96% hingga homogen kemudian digabung dalam wadah yang sama. Pada wadah yang berbeda, Asam askorbat 0,1gr, mentol 0,1gr dilarutkan ke dalam etanol 96% hingga larut sempurna, selanjutnya ditambahkan Propylene glycol 15ml dan dihomogenkan. Selanjutnya dimasukkan campuran ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) dan asam askorbat tadi sedikit demi sedikit, diaduk hingga kedua campuran menyatu dan homogen. Selanjutnya dicukupkan volumenya dengan aquadest (Hasma et al., 2023).

3.15 Evaluasi *Hair Tonic*

3.15.1 Uji Organoleptik

Sediaan *hair tonic* diamati mengenai perubahan warna, bau dan tekstur sediaan. Pengamatan organoleptis dilakukan guna mendapatkan perubahan fisik dari *hair tonic*. Syarat mutu SNI 16- 4955-1998 dari sediaan *hair tonic* yang baik uji organoleptik seperti warna, bau dan tekstur (Arifin,2021).

3.15.2 Uji pH

Uji pH diamati dengan menggunakan pH meter dengan menggunakan elektroda yang telah dikalibrasi. Dibilas dengan menggunakan aquades, dicelupkan pada sediaan hingga kedalaman 3 cm sehingga pH larutan uji berada pada kisaran 4 sampai 7. Menurut SNI 16-4955-1998 yang menyatakan bahwa pH sediaan *hair tonic* berkisar antara 3,0-7,0 sesuai dengan pH kulit kepala (Hasma et al., 2023).

3.15.3 Uji Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer brookfield yang akan dicelupkan dalam formula sediaan *hair tonic* kemudian diaktifkan skala pengujian viskositas dibaca hingga terdeteksi data yang stabil. skala yang ditunjukkan dibaca hingga menunjukkan angka yang ditetapkan SNI 16-4955-1998 yang menyebutkan yaitu <5 cps (Hasma et al., 2023).

3.15.4 Uji Iritasi

Untuk memastikan apakah sediaan dengan formulasi F0, F1, F2, dan F3 menyebabkan iritasi kulit atau tidak, dilakukan uji iritasi kulit. Sediaan dioleskan di belakang daun telinga dan dicatat adanya tanda-tanda kemerahan, gatal, dan bengkak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sediaan *hair tonic* tidak menyebabkan iritasi kulit (Hasma et al., 2023).

3.15.5 Uji Homogenitas

Uji Homogenitas Sampel diambil 1 pipet tetes diletakkan di objek gelas, selanjutnya diamati dengan tujuan untuk melihat apakah ada partikel kasar atau endapan yang terbentuk pada sediaan tersebut (Hasma et al., 2023).

3.16 Uji Kemampuan Antijamur *Hair Tonic* Herbal Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper batle L.*) Terhadap Jamur *Pityrosporum ovale* dan *Microsporum canis*

Penentuan aktivitas antijamur *hair tonic* ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) dilakukan dengan metode difusi cakram yang hasil akhir terbentuknya zona bening atau zona hambat disekitar kertas cakram yang telah ditetesi dengan ekstrak daun sirih hijau sesuai dengan konsentrasi yang dibuat. Zona hambat ini kemudian diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong untuk mengetahui besar daya hambat antifungalnya.

1. *Pityrosporum ovale*

Diambil suspensi jamur *Pityrosporum ovale* menggunakan *cotton bud* dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang telah berisi media PDA padat yang telah di buat sebelumnya. kontrol positif yaitu *hair tonic* mustika ratu, kontrol negatif menggunakan cakram kosong ditetesi *hair tonic* tanpa ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) dan perlakuan menggunakan formula *hair tonic* herbal ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) dari beberapa konsentrasi dan dilakukan inkubasi selama 2x24 jam.

2. *Microsporum canis*

Diambil suspensi jamur *Microsporum canis* menggunakan *cotton bud* dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang telah berisi media PDA padat yang telah di buat sebelumnya. kontrol positif yaitu *hair tonic* mustika ratu, kontrol negatif menggunakan cakram kosong ditetesi *hair tonic* tanpa ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) dan perlakuan menggunakan formula *hair tonic* herbal ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) dari beberapa konsentrasi dan dilakukan inkubasi selama 3x24 jam.

3.17 Pengukuran Zona Hambat

Setelah dilakukan inkubasi selama 2x24 jam, kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat di sekitar cakram kertas pada masing-masing kelompok menggunakan jangka sorong. Pengukuran zona hambat yang berbentuk lingkaran dilakukan dengan cara dihitung dalam satu millimeter (mm) menggunakan jangka sorong (Magvirah,2019)

$$\text{Diameter zona hambat (d)} = \frac{(DV-DC)+(DH-DC)}{2} \dots\dots\dots (1)$$

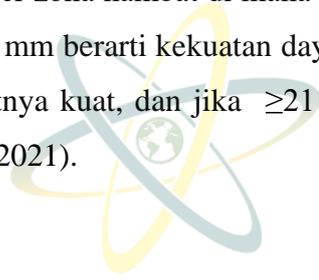
D = diameter zona hambat

DV = diameter vertikal

DH = diameter horizontal

DC = diameter cakram

Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan berdasarkan penggolongan kekuatan daya antijamur. Kategori zona hambat di golongan berdasarkan kategori diameter zona hambat di mana diameter ≤ 5 mm berarti daya hambatnya lemah, jika 6-10 mm berarti kekuatan daya hambatnya sedang, jika 11-20 mm berarti daya hambatnya kuat, dan jika ≥ 21 mm berarti daya hambatnya sangat kuat (Tjiptoningsih, 2021).



UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
SUMATERA UTARA MEDAN