

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah keseluruhan objek yang menjadi fokus studi. Populasi yang digunakan adalah daun sawo manila (*Manilkara zapota* L.) yang diperoleh dari wilayah Plaosan, Kabupaten Magetan, Jawa Timur .

2. Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi yang merepresentasikan karakteristik populasi tersebut. Dalam penelitian ini, sampel yang dipakai adalah daun sawo manila yang berwarna hijau dengan helai daun bertepi rata dan sedikit berbulu, masih segar, serta diambil pada pagi hari. Sampel ini kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi di laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah sediaan krim antibakteri yang mengandung ekstrak daun sawo manila dengan variasi konsentrasi asam stearat dan trietanolamin.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas adalah variabel yang bisa diubah dan mempengaruhi variabel lain, yaitu variasi konsentrasi asam stearat dan trietanolamin dalam formulasi krim. Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi, yaitu pengujian aktivitas antibakteri dan stabilitas fisik krim terhadap *Staphylococcus aureus* (Creswell, 2014).

3. Definisi operasional variabel utama

1. Serbuk daun sawo manila adalah bubuk yang diperoleh dari daun hijau *Manilkara zapota* L. yang dikumpulkan di Plaosan, Mageta.

2. Ekstrak adalah produk pekat hasil isolasi zat aktif dari simplisia menggunakan pelarut sesuai metode tertentu, dalam hal ini maserasi dengan etanol 96%, lalu diperkaya menggunakan rotary vacuum evaporator pada suhu 40°C (Sethi, 1996).

3. Krim merupakan sediaan semi padat berupa emulsi dengan kandungan air kurang dari 60%, untuk aplikasi topikal yang berkualitas baik ditandai dengan tekstur lembut, mudah dioleskan, mudah

dibersihkan, stabil, dan mampu melepaskan zat aktif (Ansel *et al.*, 2011).

4. Karakteristik fisik krim dinilai melalui berbagai uji seperti organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan stabilitas (Carstensen, 2005).

5. Kontrol positif adalah kelompok yang menerima perlakuan dengan hasil yang telah diketahui (Polit & Beck, 2010).

6. Kontrol negatif adalah kelompok yang menggunakan basis krim tanpa zat aktif (Polit & Beck, 2010).

7. Aktivitas antibakteri adalah kemampuan suatu zat untuk menghambat pertumbuhan bakteri, yang diukur melalui zona hambat pada uji difusi sumuran terhadap *S. aureus* (Balouiri *et al.*, 2016).

8. Diameter zona hambat adalah ukuran yang menunjukkan luas area penghambatan pertumbuhan bakteri oleh krim ekstrak daun sawo manila (Balouiri *et al.*, 2016).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan meliputi mortar dan stamper untuk membuat krim, batang pengaduk, sendok, cawan, gelas ukur, pH meter, alat uji daya lekat dan sebar, viskometer, stopwatch, oven, *rotary evaporator*, *water bath*, serta alat penunjang laboratorium lainnya (Harborne, 1998).

2. Bahan

Bahan penelitian terdiri dari daun sawo manila (Manilkara zapota L.), media tanam mikroba seperti Nutrient Agar (NA), Mueller Hinton Agar (MHA), Vogel Johnson Agar (VJA), pelarut etanol 96%, trietanolamin, asam stearat, gliserin, nipagin, nipasol, cetyl alkohol, aquadest, reagen Dragendorff, Mayer, metilen biru, HCl pekat, NaCl, serta kultur bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

D. Jalanya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Sampel daun sawo manila diidentifikasi dengan mencocokkan karakteristik morfologi menggunakan kunci determinasi di laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta untuk memastikan keaslian bahan yang digunakan adalah benar sesuai yang diharapkan (Jain, 2012).

2. Pengumpulan bahan

Daun segar yang digunakan berasal dari Plaosan, Magetan, dipilih sesuai kondisi daun hijau segar dan tidak rusak serta memenuhi kriteria dipetik pada pagi hari saat daun masih segar agar ekstrak optimal.

3. Tahap Sortasi

3.1 Sortasi basah. Dilakukan bersamaan dengan pencucian untuk menghilangkan kotoran dan mikroorganisme menggunakan air bersih dari sumber yang tidak tercemar (Depkes RI, 1985).

3.2 Sortasi kering. Memisahkan bagian tanaman yang tidak diinginkan secara manual setelah dilakukan pengeringan (Depkes RI, 1985).

4. Penyerbukan

Daun yang telah kering dihaluskan menggunakan blender lalu disaring dengan ayakan 100 mesh agar tidak ada yang menggumpal dalam serbuk. Serbuk disimpan dalam wadah kedap udara (Khandelwal, 2007).

5. Penetapan kadar kelembapan serbuk daun sawo

Kadar air serbuk diukur dengan alat pengukur kelembapan di laboratorium untuk memastikan tingkat kelembapan sesuai standar (Avwioro & Chukwurah, 2011). Alat ini diukur terlebih dahulu dengan tepat dan suhunya sesuai dengan jumlah simplisia yang diujikan. Setelah itu, timbang dua gram serbuk daun sawo dimasukkan ke dalam alat, dan hasilnya dicatat dalam persen pada layar keseimbangan kelembapan. Tujuannya adalah untuk mengurangi tingkat kelembapan.

6. Pembuatan ekstrak daun sawo manila

Simplisia ditimbang lalu diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% selama 5 hari dengan pengocokan berkala. Filtrat disaring dan proses maserasi diulang sebanyak tiga kali dengan penggojokan. Ekstrak pekat diperoleh dengan rotary evaporator pada suhu 40°C (Kumar *et al.*, 2013).

7. Uji susut pengeringan ekstrak daun sawo manila

Satu gram ekstrak disebar sedikit demi sedikit hingga tipis pada krus porselen dan dikeringkan pada suhu 105°C hingga berat konstan untuk menghitung kehilangan bobot akibat pengeringan (Rajput *et al.*, 2010).

8. Uji bebas alkohol ekstrak etanol daun sawo manila

Uji ini dilakukan untuk memeriksa kandungan alkohol ekstrak dengan menambahkan reagen asam sulfat pekat dan pemanasan. Tidak tercium bau ester menandakan ekstrak bebas alkohol (Sayuti, 2015).

9. Analisis Fitokimia Ekstrak Daun Sawo Manila

9.1 Uji Tanin. Ekstrak dilarutkan dalam air, disaring, lalu dipipet dan ditambahkan larutan FeCl_3 . Perubahan warna menjadi biru atau hijau kehitaman menunjukkan keberadaan tanin (Harborne, 1998).

9.2 Uji Flavonoid. Ekstrak direbus dalam air, disaring, kemudian diberikan serbuk magnesium dan asam klorida pekat. Warna merah, jingga, atau kuning menandakan flavonoid hadir (Harborne, 1998).

9.3 Uji Saponin. Ekstrak dilarutkan, disaring, dan dikocok keras. Penambahan asam klorida dan pengocokan lanjutan menghasilkan buih apabila saponin ada dalam ekstrak (Harborne, 1998).

10. Formulasi dan Pembuatan Sediaan Krim

Tabel 1. Formulasi sediaan krim

Bahan	Formula			Fungsi
	F1	F2	F3	
Ekstrak etanol daun sawo	10	10	10	Zat aktif
Trietanolamin	2	3	4	Emulgator
Asam stearat	10	11	12	Emulgator
Gliserin	8	8	8	Humektan
Cetyl alcohol	3	3	3	Penstabil krim
Nipagin	0,15	0,15	0,15	Pengawet
Nipazol	0,15	0,15	0,15	Pengawet
Oleum Rosae	Qs	Qs	qs	Pewangi
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	Pelarut

Keterangan :

F1 : formula krim I asam stearate 10% dan TEA 2%

F2 : formula krim II asam stearate 11% dan TEA 3%

F3 : formula krim III asam stearate 12%
dan TEA 4%

Krim yang mengandung ekstrak etanol daun sawo manila (*Manilkara zapota* L.) diformulasikan menggunakan trietanolamin, asam stearat, gliserin, cetyl alkohol, nipagin, nipazol, oleum rosae, dan aquadest. Konsentrasi ekstrak etanol daun sawo yang digunakan adalah 10% dengan variasi konsentrasi asam stearat sebesar 10%, 11%, dan 12%.

Proses pembuatan krim dimulai dengan memanaskan fase air yang terdiri dari aquadest, gliserin, trietanolamin, dan nipagin pada

suhu 70°C menggunakan water bath. Sementara itu, fase minyak yang terdiri dari asam stearat, cetyl alkohol, dan nipasol dilelehkan pada suhu yang sama. Setelah keduanya mencapai suhu yang sesuai, kedua fase dicampur secara bersamaan ke dalam mortir dan diaduk hingga membentuk krim homogen. Selanjutnya ekstrak etanol daun sawo ditambahkan dan diaduk hingga merata, diikuti dengan penambahan oleum rosae yang juga diaduk hingga tercapai keseragaman (Ansel *et al.*, 2011).

Setelah pembuatan, krim dievaluasi dari segi mutu dan stabilitas fisiknya. Formulasi yang paling stabil kemudian diuji aktivitas antibakterinya terhadap *Stapylococcuss aureus*.

11. Evaluasi Mutu Fisik Krim

11.1 Organoleptis. Pengujian ini meliputi penilaian warna, aroma, dan tekstur krim untuk menilai kenyamanan dan kesesuaian produk bagi pengguna (Hirsch, 2008).

11.2 Homogenitas. Homogenitas diuji dengan mengambil sekitar 100 mg krim, meletakkannya setipis mungkin pada kaca objek, menutup dengan kaca penutup, dan mengamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali untuk melihat distribusi partikel (Carstensen, 2005).

11.3 pH. Satu gram krim dilarutkan dalam 10 ml aquadest, diaduk hingga homogen. pH diukur menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi pada larutan standar pH 7 dan pH 4, dengan suhu pengukuran sekitar 25°C (Lionberger & Mirletz, 2002).

11.4 Viskositas. Viskositas diukur menggunakan alat viskometer Brookfield dengan spindle No.6 pada suhu 25°C, untuk menentukan tingkat kekentalan sediaan krim. Nilai viskositas yang diharapkan antara 2000 hingga 50000 cP (Carstensen, 2005).

11.5 Daya lekat. Sebanyak 0,5 gram krim diletakkan di atas kaca objek, ditutup dengan kaca objek lain, dan diberikan beban 1 kg selama tiga menit. Waktu yang dibutuhkan agar kedua kaca tersebut terpisah menunjukkan kekuatan daya lekat krim (Ulaen *et al.*, 2012).

11.6 Daya sebar. Satu gram krim diletakkan di tengah cawan petri terbalik yang dilapisi plastik. Beban 125 gram diletakkan di atasnya selama satu menit, kemudian diameter penyebaran krim diukur menggunakan penggaris. Pengujian dilakukan selama 4 siklus selama 12 hari (Garg *et al.*, 2002).

11.7 Uji Tipe Krim. Untuk menguji tipe krim, ada 3 cara yaitu: Daya hantar listrik, dispersi larutan zat warna dan cara pengenceran.

- Metode daya hantar listrik Krim dimasukkan dalam gelas kimia dan dikaitkan dengan rangkaian listrik. Jika lampu menyala, emulsi adalah minyak dalam air (o/w) (Schmidt & Engelhardt, 2001).
- Metode Dispersi Larutan Zat Warna Metilen biru ditambahkan ke krim dalam vial, jika warna menyebar rata, krim bertipe o/w (Schmidt & Engelhardt, 2001).
- Metode Pengenceran Penambahan air pada krim dalam vial. Jika krim dapat bercampur dan tercampur dengan air, emulsi termasuk tipe o/w (Schmidt & Engelhardt, 2001).

11.8 Cycling test. Krim diuji stabilitasnya dengan penyimpanan bergantian selama 24 jam di suhu 4°C dan 24 jam pada suhu 40°C, dilakukan selama enam siklus. Setelah setiap siklus, diamati perubahan homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, dan viskositas (Wardani, 2016).

12. Sterilisasi Alat

Alat-alat uji antibakteri dicuci menggunakan aquadest, dikeringkan, dibungkus menggunakan kertas steril, lalu disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Graziano *et al.*, 2014).

13. Pembuatan Media Uji NA

Nutrient Agar (NA) sebanyak 20 gram dilarutkan dalam 1000 ml aquadest, dipanaskan hingga larut sempurna selama 10-15 menit, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah dingin, media dituangkan ke dalam cawan petri untuk pemakaian (Tortora *et al.*, 2010)

14. Peremajaan Bakteri Uji

Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dikulturkan pada media NA dalam tabung reaksi, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Suherman *et al.*, 2018).

15. Pembuatan Suspensi Uji

Koloni bakteri diambil dengan ose steril dan disuspensikan dalam NaCl 0,95% sebanyak 2 ml pada tabung reaksi, kemudian distandarkan kekeruhannya menggunakan larutan McFarland (Rundengan *et al.*, 2017).

16. Identifikasi Bakteri Uji

16.1 Makroskopis. Koloni *S. aureus* berwujud bulat, halus, mengkilap dengan warna abu-abu sampai kuning keemasan. *S. aureus* memiliki kapsul polisakarida yang membantu penyebarannya dan berbeda dari *Staphylococcus* lain karena fermentasi manitol dan sifat koagulase positif (Purnomo *et al.*, 2006).

16.2 Uji Biokimia. Uji biokimia adalah rangkaian pemeriksaan yang digunakan untuk mengenali dan membedakan berbagai spesies bakteri berdasarkan karakteristik enzim dan proses metabolisme yang dimilikinya. Beberapa uji biokimia dalam identifikasi *Staphylococcus aureus*:

16.2.1 Uji katalase. Penambahan H_2O_2 menghasilkan gelembung jika positif (Baron, 1996).

16.2.2 Uji koagulase. Suspensi menghasilkan penggumpalan pada uji slide dengan menggunakan plasma, menandakan positif *S. aureus* (Baron, 1996).

17. Uji Aktivitas Antibakteri

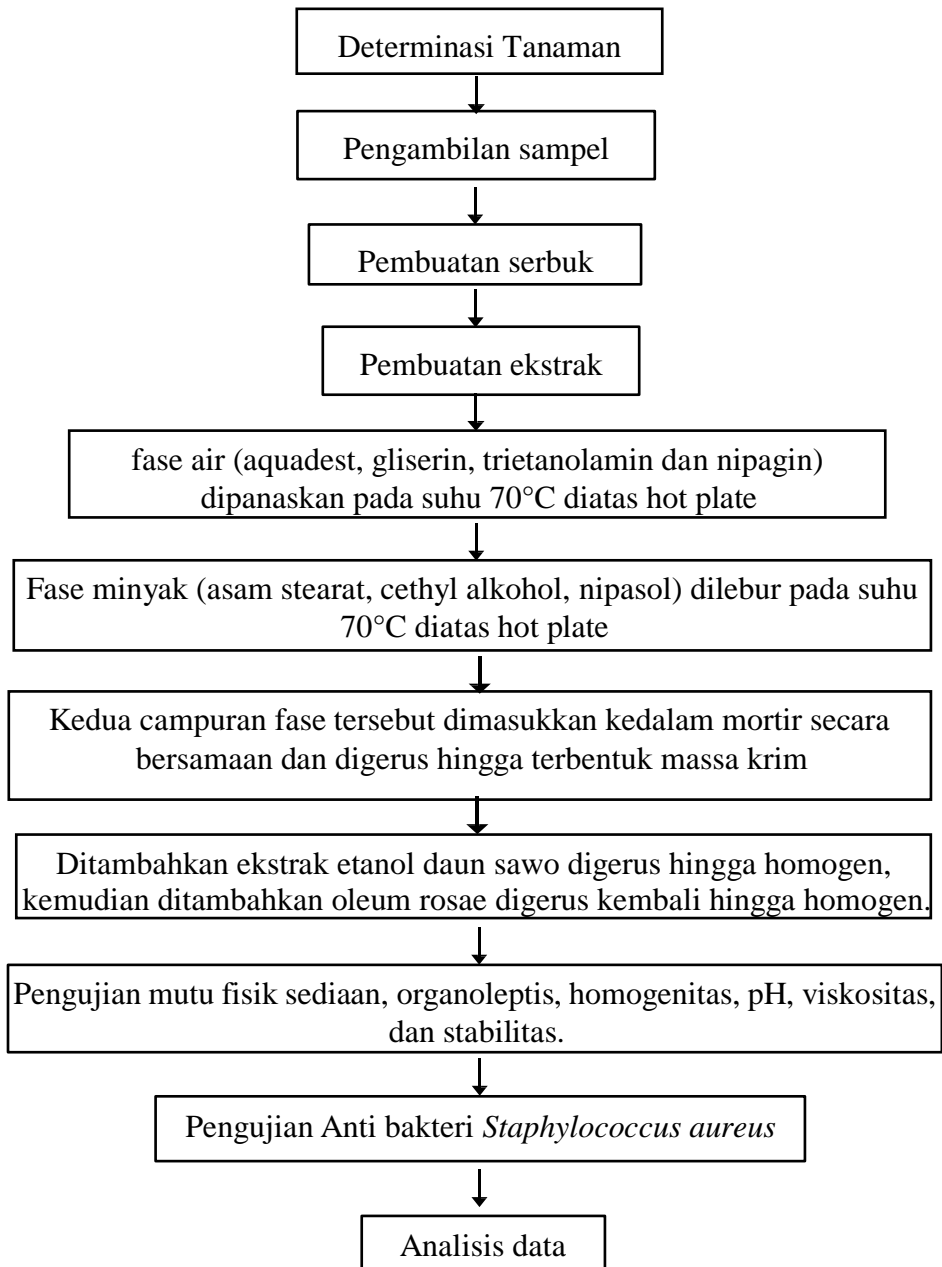
Metode yang digunakan adalah uji difusi sumuran untuk menentukan zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan krim ekstrak daun sawo manila 10%. Lima sumuran dibuat pada media inokulasi bakteri; sumuran 1-3 diisi dengan krim ekstrak dengan tiga variasi formulasi, sumuran 4 sebagai kontrol positif (vancomycin cream), dan sumuran 5 sebagai kontrol negatif (basis krim tanpa ekstrak). Setiap sumuran diisi 50 μ L, diuji sebanyak tiga kali, dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam sebelum pengamatan zona hambat dilakukan (Yusriana *et al.*, 2014).

18. Pengukuran Zona Hambat

Diameter zona hambat diukur menggunakan mistar berskala dan jangka sorong sebanyak tiga kali dari arah berbeda untuk akurasi. Hasil dibandingkan dengan standar CLSI, di mana diameter zona hambat ≥ 19 mm menunjukkan sensitivitas bakteri, ≤ 14 mm menunjukkan resistensi, dan 14-19 mm tergolong intermediet (Jennings & Spring, 2009).

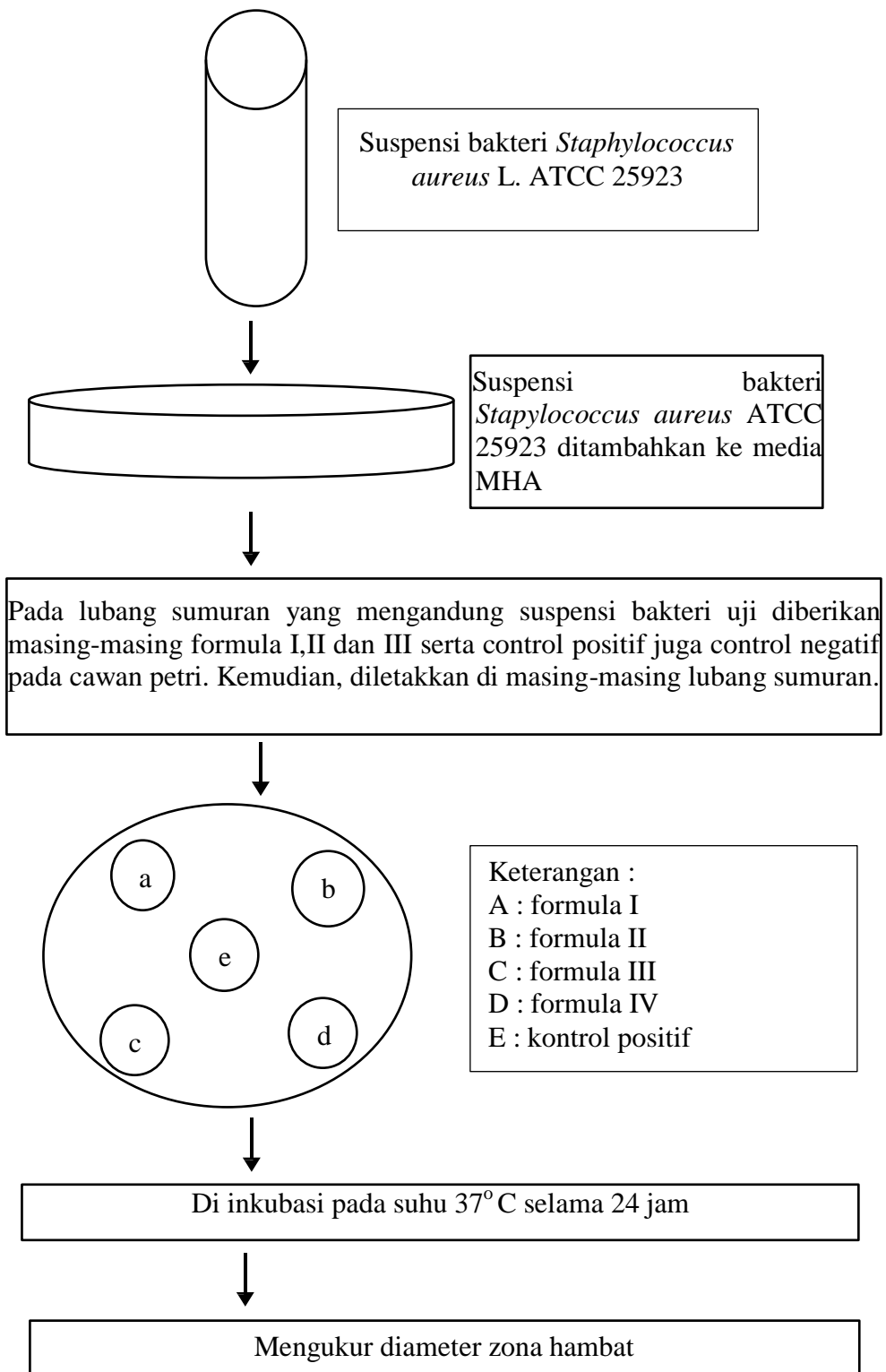
E. Skema Penelitian

1. Pembuatan Sediaan Krim



Gambar 4. Skema Pembuatan krim

2. Pengujian antibakteri



Gambar 5. Skema Pengujian anti-bakteri

F. Analisis Hasil

Penelitian ini menggunakan pendekatan kualitatif serta metode difusi, dimana pengumpulan data dilakukan melalui pengamatan dan pengukuran terhadap kinerja dari tiga formula yang telah disusun. Semua pengujian dan observasi dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Setiabudi Surakarta. Data yang dikumpulkan meliputi karakteristik mutu fisik dan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri.

Analisis mutu fisik menggunakan perangkat lunak SPSS dengan uji Kolmogorov-Smirnov untuk memeriksa normalitas data serta uji One-Way ANOVA untuk mengetahui pengaruh variasi basis terhadap mutu fisik. Sedangkan data aktivitas antibakteri, yang diukur berdasarkan diameter zona hambat, juga dianalisis menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov dan One-Way ANOVA dengan bantuan SPSS.