# BAB III

# METODOLOGIPENELITIAN

## 3.1 RancanganPenelitian

Jenispenelitianadalaheksperimental.Penelitianinimeliputipengumpulanbahantumbuhan,pengolahansampel,pembuatanekstrak,karakteristiksimplisia,skrining fitokimia,evaluasisediaan hidrogel.

### VariabelPenelitian

Variabelbebaspadapenelitianiniadalah formulasisediaannanohydrogel dariekstrak etanol daun rambai dan variabel terikatnya uji dayahambatsediaannanohidrogeldariekstraketanoldaunrambaiterhadapbakteri*Staphylococcusaureus**.*

## JadwaldanLokasiPenelitian

### 3.2.1 JadwalPenelitian

PenelitianinidilaksanakanpadabulanJanuari 2024sampaidenganselesai.

### LokasiPenelitian

PenelitianinidilakukandiLaboratoriumTerpaduUniversitasMuslimNusantara Al-WashliyahMedan.

## Alat Dan Bahan

## 3.3.1 Alat

Alat-alatyangakandigunakan dalampenelitianiniadalahbejanamaserasi,*magneticstirrer*(DLAB),*hotplate*(Cimarec+),timbangananalitik(ACISAD-300i),*ParticleSizeAnalyzer*(horibascientificsz-100),pHmeter digital(Lutron), viskometerstormer (NDJ-5S), Autoklaf, Hot Plate, Oven,alat-alatglass(pyrex),   cawanporselen, mortir, dan sendok tanduk.

### 3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrakdaunrambai,Carbopol, *Triethanolamine* (TEA),Etanol96%, Asam Klorida Pekat, Asam Sulfat, Besi (iii), Timbal (ii) Asetat 0,4m, Iodium, Toluene, Nacl 0,9%, *Mueller Hinton Agar* (MHA),Propilen glikol,MetilParaben, Bouchardat, Gliserol, Tetrasiklin, DMSO, Aquadest, Kertas Cakram dan Biakan bakteri *Staphylococcus aureus*.

## 3.4 IdentifikasiSampel

Sampel yang digunakanpada penelitian inidiidentifikasidiLaboratorium*HerbariumMedanense*(MEDAN), Universitas SumateraUtara.

## 3.5 PengumpulandanPengolahanSampel

### 3.5.1 MetodePengumpulanSampel

Sampelyangdigunakanadalahdaunrambaiyangmasihsegardanberwarnahijau.Pengambilansampeldilakukansecarapurposiftanpamembandingkantumbuhanyang sama dari daerah lain, diambil di daerah Desa Tualang, Kecamatan Peureulak Kota,KabupatenAceh Timur,Provinsi Aceh.

### PengolahanSampel

Daunrambai*,*segaryangtelahdikumpulkan,disortasibasahyaitumemisahkandaun rambai dari bagian tumbuhan yang terikut, kotoran-kotoran atau bahan asinglainnya, kemudian daun rambai, yang telah terkumpul dicuci untuk menghilangkankotoran yang melekat. Pencucian dilakukan dengan air kran yang mengalir, ditiriskan,laluditimbang diperoleh berat gram.

Kemudian dimasukkan ke dalam lemari pengering dengan suhu 40-500C.simplisia yang telah kering disortasi kering yaitu memisahkan benda-benda asing

seperti pengotoran-pengotoran lain yang terjadi selama pengeringan.Setelah disortasi,ditimbangkembali.Simplisiakeringselanjutnyadiserbukdenganmenggunakanblender.Serbuksimplisiadisimpandalamplastikuntukmencegahlembabdanpengotoranlainnyasebelum di ekstraksi (Depkes,1989).

### KarakteristikMakroskopikdanMikroskopik

1. Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap daun dengan mengamati bentuk,warna,rasa, bau dan ukuran.
2. Pemeriksaanmikroskopikdilakukanterhadapserbuksimplisiadaunrambai(*Baccaureamotleyana*),dengancaradiletakkansedikitpadakacaobjekyangtelahditetesi dengan larutan kloralhidrat dan ditutupi dengan kaca penutup selanjutnyadiamatidibawah mikroskop.

##  PembuatanLarutanPereaksi

### LarutanBouchardat

Kaliumiodidasebanyak4 gditimbang,kemudiandilarutkandalamairsecukupnya sampai iodida larut sempurna, kemudian 2 g iodium dilarutkan dalamkalium iodida, lalu dicukupkan volumenya dengan air suling hingga 100 mL (DepkesRI,1989).

### LarutanPereaksiMayer

Raksa (II) klorida sebanyak 1,35 g dilarutkan ke dalam 60 ml air suling,pada wadah lain dilarutkan 5 g kalium iodida 10 mL air suling, kemudian larutandicampurkandandiencerkandenganair sulinghingga100 mL(DepkesRI,1989).

### LarutanPereaksiDragendroff

Bismuth (II) nitrat sebanyak 0,85 g dilarutkan dalam 10 mL asam asetat*glacial*, lalu ditambahkan 40 mL air suling. Pada wadah lain sebanyak 8 g kaliumiodida dilarutkan dalam 30 mL air suling, kemudian kedua larutan dicampurkan samabanyak, lalu ditambahkan 20 mL asam asetat glacial dan diecerkan dengan air sulinghinggavolume 100 ml (Depkes RI, 1989).

### LarutanPereaksiMolish

Ditimbang sebanyak 3 g α-naftol pekat dengan menggunakan neraca analitik,kemudian dilarutkan dalam beaker glass, ditambahkan etanol 96% hingga diperolehlarutan100 mL (Depkes RI, 1995).

### LarutanPereaksiLiberman-burchard

Sebanyak 20bagian asam asetat anhidrat dicampurkan dengan 1 bagian asamsulfatpekatdan50bagiankloroform.Larutanpereaksiharusdibuatbaru

### LarutanPereaksiAsamKlorida2N

Asam klorida pekat sebanyak 17 mL diencerkan dengan air suling secukupnyasampaivolume100 mL (Depkes RI, 1989).

### LarutanPereaksiTimbal(II)Asetat0,4N

Ditimbang sebanyak 15,17 g timbal (II) asetat kemudian dilarutkan ke dalambeakerglass,laludicukupkandenganairbebaskarbondioksidahinggavolume 100mL(DepkesRI, 1989).

### LarutanPereaksiBesi(III) Klorida1%

Ditimbangsebanyak1gbesi(III)klorida,dilarutkankedalambeakerglasskemudiandicukupkan volumenyahingga 100mL (Depkes RI, 1979).

### LarutanPerekasiNatriumHidroksida2N

Ditimbangsebanyak8gnatriumhidroksidadilarutkankedalambeakerglass,kemudiandicukupkanvolumenyadenanakuadessampai100mL(Depkes RI,1979).

## KarakteristikSimplisia

* + 1. **Penetapan Kadar Air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotropi (destilasi toluen). Alat terdiri dari alas bulat 500 mL, alat penampung, pendingin, tabung penyambung, dan tabung penerima 10 mL. Langkah pertama dilakukan penjenuhan toluen. Sebanyak 200 mL toluen dan 2 mL air suling dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipasang alat penampung dan pendingin kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Kemudian ke dalam labu tersebut dimasukkan 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluene memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Syarat kadar air pada umumnya tidak lebih dari 10%. Apabila kadar air lebih besar 10% maka simplisia tersebut akan mudah ditumbuhi kapang pada saat penyimpanan (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Penetapan Kadar Sari Larut Air**

5 g serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml kloroforom P (2,5 mL kloroforom dalam 1000 mL aquadest) selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata (yang telah ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105oC hingga bobot tetap (Depkes RI, 1979). Penetapan kadar sari larut air bertujuan untuk mengetahui kadar senyawa kimia yang bersifat polar yang terkandung didalam sampel (Depkes RI, 2000).

* + 1. **Penetapan Kadar Sari Larut Etanol**

5 g serbuk simplisa dimaserasi dengan 100 ml etanol selama 24 jam, menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal (Depkes RI, 1979). Penetapan kadar sari larut dalam etanol dilakukan untuk mengetahui kadar senyawa larut dalam etanol baik senyawa polar dan non polar (Depkes RI, 2000).

* + 1. **Penetapan Kadar Abu Total**

Sebanyak 2 g serbuk dimasukkan kedalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditara, diratakan. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pijaran dilakukan pada suhu 500 - 600ºC selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang dikeringkan. Penetapan kadar abu total bertujuan untuk mengetahui kandungan mineral setelah pemijaran yang meliputi abu fisiologis yang berasal dari jaringan tanaman itu sendiri yang terdapat didalam simplisia yang merupakan residu dari proses pengekstraksian (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, didihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas, residu dengan kertas saring dipijarkan sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan. Penetapan kadar abu tidak larut asam bertujuan untuk menunjukkan jumlah silikat seperti pasir dan tanah yang terdapat pada simplisia dengan cara melarutkan abu total dalam asam klorida (Depkes RI, 1979).

## SkriningFitokimia

### PemeriksaanAlkaloida

Daun rambai segar serbuk simplisia dan ekstrak di timbang masing-masingsebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling,dipanaskandiataspenangasairselama2 menit,didinginkandandisaring.Filtratyangdipakaiuntuk tes alkaloida sebagai berikut :

1. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi mayer, reaksi positifditandaidenganterbentuknyaendapanmenggumpal berwarnaputih ataukuning.
2. Filtratsebanyak3tetesditambahkandengan2tetespereaksibouchardat,reaksipositifditandaidengan terbentuknyaendapan berwarnacoklat sampaihitam.
3. Filtratsebanyak3tetesditambahkandengan2tetespereaksidragendorf,reaksipositifditandai dengan terbentuknya warnamerahatau jingga.

Alkaloidpositifjikaterjadiendapanataukekeruhan2reaksidari3percobaandiatas(Depkes RI, 1995).

### PemeriksaanFlavonoid

Ditimbang daun rambai, segar serbuk simplisia dan ekstrak masing-masingsebanyak 10 g ditambahkan 10 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaringdalam keadaan panas, kedalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah.flavonoid positif jika terjadi warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol(Depkes RI, 1995).

### PemeriksaanSaponin

Ditimbang daun rambai segar, serbuk simplisia dan ekstrak masing-masingsebanyak 0,5 g dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml airpanas,didinginkankemudiandikocokkuat-kuatselama10detik.Jikaterbentukbusasetinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang denganpenambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI,1995).

### PemeriksaanTanin

Ditimbang daun rambai segar, serbuk simplisia dan ekstrak masing-masingsebanyak 1 g, dididihkan selama 3 menit dalam 100 ml air suling lalu didinginkandan disaring, larutan diambil 2 ml ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanyatanin(Depkes RI, 1995).

### Steroid/triterpenoida

Ditimbang daun rambai segar, serbuk simplisia dan ekstrak masing-masingsebanyak 1 g dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu dimaserasi dengan 20 ml eterselama 2 jam, setelah itu disaring. Filtrat yang di dapat diuapkan hingga kental danditambahkan 3 tetes asam asetat anhidrat, dan 1 tetesasam sulfat pekat (reaksiliebermann-burchard). Timbulnya warna biru atau biru hijau menunjukkan adanyasteroida,sedangkanwarnamerah,merahmudaatauungumenunjukkanadanyatriterpenoid(Harborne, 1987).

## ProsesPembuatanEkstrakDaunRambai

Pembuatan ektrak etanol daun rambai dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia 10 bagian (500 g) dimasukkan ke dalam bejana kemudian tuangkan 75 bagian (3750 mL) cairan penyari etanol lalu ditutup sambil diaduk sesekali dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya matahari. Setelah 5 hari campuran ampasnya diperas.Cuci ampasnya dengan cairan penyari etanol secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (5 liter) maserat.Meserat kemudian dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari, dan disaring. Maserat lalu dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* lalu ditimbang (Depkes, 1989).

## 3.10 FormuladanPembuatanSedianNanoHidrogelDariEkstrakDaun

##  Rambai (*Baccaureamotleyana*)

Formuladanpembuatansediannanohidrogeldariekstrakdaun rambai (*Baccaureamotleyana*) dapat dilihat padaTabel 3.1

**Tabel3.1**Formula Sediaan Nano Hidrogel

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bahan** | **Formulas (g)** |  **Blanko** |
| Ekstrak daun rambai |  2 |  4 |  6 |  - |
| Carbopol |  0,75 |  0,75 |  0,75 |  0,75 |
|  Nac metil paraben |  0,1 |  0,1 |  0,1 |  0,1 |
| Propilen glikol (ml) |  2 |  2 |  2 |  2 |
| Gliserol (ml) |  12,5 |  12,5 |  12,5 |  12,5 |
| TE TEA (ml) |  q.s |  q.s |  q.s |  q.s |
| Aqu Aquadest ad |  100 |  100 |  100 |  100 |

## 3.11 PembuatanNanoHidrogel

Carbopol dimasukkan kedalam lumpang panas lalu dimasukkan *aquadest*, kemudiangerus sampai homogen. Tambahkan metil paraben yang telah dilarutkan dalam propilen glikol diaduk hingga homogen. Lalu ditambahkan gliserin diaduk hingga homogen. Kemudian campuran tersebut ditetesi TEA (*triethanolamine)* sampai pH netral. Selanjutnya ditambahkan ekstrak daun rambai, kemudian ditambahkan sisa *aquadest* dan diaduk homogen dengan homogenizer.

## EvaluasiMutuSediaanNanoHidrogel

### 3.12.1 Organoleptis

Uji ini dilakukandengan mengamatiwarna,bentukdanbau darisediaankemudianhasil yang didapatkandicatat (Nabillah, 2022).

### Homogenitas

Sediaan nano hidrogel diujihomogenitasnyasecaravisual.Pengujianinidilakukandengancaramengoleskan3bagianatas,tengah danbawahpadakacabeningselanjutnya ditutupdengan kaca objekagardapatmelihat kejernihan dalam sediaan nano hidrogel(Nabillah,2022).

### pH

Sebelumnya dilakukan kalibrasi alat dengan larutan buffer pH 4.0 dan pH 7.0. Penentuan pH dilakukan dengan cara mencelupkan elektroda pH meter ke dalam hidrogel, mengamati angka yang tertera pada monitor. Hidrogel yang baik harus memiliki pH yang sesuai dengan pH kulit yaitu 4-6,5 (Chasanah *et al.,* 2019).

### Viskositas

Sediaandiujidenganmenggunakanalatviskometer stormermenggunakanspindle no 3 untuk menentukan viskositas formula. Kecepatan yang digunakan yaitu30 rpm kemudian hasil yang didapatkan dicatat dalam satuan cps(centipoise) (Nabillah,2022).

### DayaSebar

Daya sebar di ukur dengan dua lempeng kaca, satu lempeng kaca diberi alas milimeter blok untuk memudahkan pengamatan dan pengukuran serta satu lempeng lagi digunakan sebagai penutup. Pengukuran daya sebar hidrogel dilakukan dengan cara meletakkan 1 g hidrogel di tengah-tengah kaca. Tutup hidrogel dengan kaca penutup dan pemberat dengan total keseluruhan bobot adalah 125 g selama 1 menit, dihitung diameter luas sebaran. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Harliatika & Noval, 2021).

### DayaLekat

Sediaan hidrogel 0,25 g diletakan diatas 2 *object glass* yang telah ditentukan. Kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu beban diangkat dari *object glass* kemudian object glass dipasang pada alat uji. Alat uji diberi beban 80 g kemudian dicatat waktu pelepasannya sampel dari *object glass* (Chasanah *et al.,* 2019).

**3.12.7 UjiIritasi**

 Uji iritasi dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan padabagianbelakangtelinga,dibiarkanterbukadandiamatiapayaangterjadi.Reaksiiritasipositif ditandai dengan kemerahan, gatal, atau bengkak pada bagian belakang telingayangdiberi perlakuan (Dasopa, 2016).

* + 1. **Uji Kesukaan**

Uji kesukaan dilakukan terhadap 12 orang sukarelawan dengan menggunakan angket. Pengujian dilakukan dengan cara sukarelawan menggunakan hidrogel dengan berbagai formulasi kemudian diminta tanggapannya dari warna, aroma, tekstur dan kesan tidak lengket (Dwi Puji Astuti).

## Penentuan Ukuran Partikel Koloid

Nanopartikel yang dihasilkan diukurmenggunakan *Particle Size Analyzer*untuk mengetahuiukuranpartikelyang didapatkan. Encerkan 5 gsediaan denganmenggunakan 1 mL *aquadest*,kemudianambil1ml sampel yang telah diencerkantadi masukkankedalamkuvet.Kuvet dimasukkankedalamsampel holderyangadapadaalat*Particle SizeAnalyzer*. Kemudian alat tersebutakanmengukurpartikeldalam waktu ± 15 menit(Nabillah, 2022).

* 1. **PenyiapanUjiAktivitasAntibakteriRegenerasiBakteri**

PembuatanMediaMediumNAsebanyak20gramdimasukkankedalamerlenmeyer lalu dilarutkan dengan 1000 ml *aquades*. Medium NB sebanyak 13 gramdimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 1000 mL aquades (Merck,1992).Mediumdipanaskanhinggamendidihdiatashotplatedanuntukmenghomogenkan dibantu dengan *magnetic stirrer*. Lalu medium disterilisasi denganmenggunakanautoklaf padasuhu1210C dengan tekanan 15lbs selama15menit.

**3.15 PenyiapanSuspensiBakteriSuspensi**

Bakteridisiapkandengancaramengambilbakteriujiyangtelahdiregenerasidengan jarum ose lalu disuspensikan ke dalam tabung reaksi berisi 5 mL larutan NaCl0,9%steril(sediaaninfusgenerik)kemudiandivortexhinggahomogen.SuspensiyangterbentukdisetarakankekeruhannyadenganlarutanstandarMcFarland0,5 yangmana kekeruhannyasetaradengankepadatanselbakteri1,5×108CFU/mL(Kumowal*etal.,*2019).

## 3.16 PengujianAktivitasAntibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri sediaan nano hidrogel ekstrak etanol daun rambaidilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang dilakukan dengan metode difusi agar (Kirby-Bauer) menggunakan kertas cakram. Kontrol positif yang digunakan adalah cakramyang berisi antibiotik tetracycline 30μg dan kontrol negatif yang digunakan adalahdimetilsulfoksida(DMSO).Masing-masingkonsentrasidilakukan3kalipengulangan.Media NA dituang sebanyak 15 ml dengan suhu 45-50°C ke dalam masing-masingcawanpetrilalubiarkanhinggamemadat.

Denganmenggunakantekniksteril,celupkan kapas bertangkai steril (cotton swab) ke dalam suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dandihilangkankelebihaninokulumdenganmenekankapasjenuhkedindingbagiandalam tabung. Kapas digoreskan ke seluruh permukaan media MHA secara merata hinggatepicawanuntukmemastikanpertumbuhanyangpadatdanmerata,kemudiandibiarkan mengering selama 5 menit.

Cakram yang telah dicelupkan kedalam larutanujiekstraketanoldaunrambai dannanopartikelsatupersatu diletakkandenganjarakyangsamadenganmenggunakanpinsetyangtelahdicelupkandalam alkohol dan dibakar. Secara perlahan, tekan setiap cakram dengan pinset untukmemastikancakrammelekatdipermukaanmediaMHA.

Cawandiinkubasidenganposisi terbalik selama 24 – 48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, zona hambatbeningyangterbentukdiukurdiametermenggunakanpenggarismilimeterdalamsatuan milimeter (mm) hingga diperoleh nilai *zone of inhibition* (ZOI) atau nilai zonahambat(Chasanah et al, 2019).

Menurut Ariyani dkk (2018), zona hambat yang termasuk pada media dapat dikatagorikan ke dalam empat katagori, yaitu:

* ZonaHambatLemah :<5 mm
* ZonaHambatSedang :5-10 mm
* ZonaHambatKuat :10-20 mm
* ZonaHambatSangatKuat :>20mm.