## BAB III

## METODE PENELITIAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 2 variabel yang meliputi : variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gel perasan bunga telang*(Clitoria ternate* L.*)*, variasi konsentrasi yang digunakan pada sediaan gel perasan bunga telang*(Clitoria ternate* L.*)*, 1%, 3% dan 5%, sedangkan variabel terikatnya yaitu pengaruh gel perasan bunga *(Clitoria ternate* L.*)* telangterhadap bakteri *staphyloccocus epidermidis* dengan konsentrasi ekstrak bunga telang 1%, 3% dan 5%.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini adalah :

1. Parameter skrining fitokimia metabolit sekunder daging daun lidah buaya meliputi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, dan glikosida.
2. Parameter karakteristik mutu fisik gel wajah dari perasan bunga telang adalah Organoleptis yaitu bau, warna, kejernihan, dan homogenitas, pH, Viskositas, Daya sebar, Daya lekat dan *Cycling test*.
3. Parameter aktivitas antibakteri dengan mengukur diameter zona hambat yang ditunjukan dengan daerah bening, yaitu daerah yang tidak ditumbuhi bakteri dalam satuan milimeter (mm).

## Jadwal dan lokasi penelitian

### 3.2.1 Jadwal penelitian

Waktu penelitian ini adalah mulai bulan Desember 2022 – Mei 2023

### 3.2.2 Lokasi penelitian

Pembuatan dan pemerasan bunga telang*(Clitoria ternate* L.*)* dilakukan di Laboratorium Obat Tradisional Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Alwashliyah. Pembuatan formulasi sediaan gel di lakukan di Laboratorium Farmasetika Farmasi Universitas Muslim Nusantara Alwashliyah.

## 3.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tumbuhan bunga telang yang segar *(Clitoria ternate* L.*)*, kloroform, isopropanol, natrium sulfat anhidrat, asam sulfat pekat, pereaksi molish, timbal (II) asetat 0,4 M, pereaksi molish, etanol, n- heksana, asam asetat anhidrada, asam klorida, besi (III) klorida, amil alkohol, serbuk magnesium, pereaksi mayar, pereaksi bouchardat, pereaksi dragendrof, Carbopol 940, Propilenglikol, TEA, Metil Paraben, Propil Paraben, Aquadest, Oleum rosae, kultur bakteri *Staphylococcus epidermidis*, NaCl, *Dymethilsulfoxide* (Dmso) 100%, NA (Nutrien Agar), Muller Hiton Agar (MHA).

## 3.4 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik, lemari pendingin, mortir dan stamper, beaker glass, gelas ukur, batang pemgaduk, kertas saring, cawan penguap, refluks, labu alas bulat, corong, kain mori, sarung tangan, ose, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen, korek api, hot plate, pinset, mikropipet, autoklaf, alat sterilisasi, alat inkubasi, cakram, mikro pipet,pipet tetes, erlenmeyer, beaker glass, kapas, kertas perkamen, aluminium foil, *cotton bud steril,* jangka sorong, penggaris, inkubator, autoklaf, oven.

## Penyiapan Sampel Penelitian

### 3.5.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan yaitu bunga telang *(Clitoria Ternatea* L.*)* yang diperoleh dari Tanjung Morawa. Pengumpulan sampel penelitian dilakukan secara purposive sampling yaitu mengambil tumbuhan dengan sengaja dari suatu tempat tanpa membandingkan dengan hasil dari daerah lain.

### 3.5.2 Determinasi Tumbuhan

Determinasi adalah proses yang dilakukan untuk melihat kebenaran asal dari simplisia yang digunakan dalam penelitian sebelum dilakukan penelitian (Pertiwi dkk, 2022). Bagian tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian bunga telang *(Clitoria ternatea* L.*)*, yang diambil dari daerah Medan. Determinasi bunga telang dilakukan dengan memeriksa ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman yang akan diteliti agar tidak terjadi kesalahan dalam mengambil tanaman untuk penelitian. Determinasi bunga telang dilakukan di Herbarium Medanese (MEDA) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Sumatera Utara.

### Pengelolaan Sampel

Penyiapan sampel bunga telang *(Clitoria ternatea* L.*)*segar 300mg yang telah dipetik kemudian dibuat perasan.

### 3.5.4 Pembuatan Perasan

Pembuatan perasan bunga telang dibuat di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi UMN Alwashliyah. Pembuatan perasan dilakukan dengan dengan proses penggilingan ataupun proses penggerusan bahan menjadi bentuk yang lebih halus sehingga mempermudah dalam mendapatkan cairan yang merupakan sari-sari tumbuhan (Dusturia, 2016).

## Pembuatan Larutan Pereaksi

### 3.6.1 Pereaksi Asam Klorida 2N

Asam klorida pekat sebanyak 17 ml ditambahkan dengan air suling sampai 100 ml ( Ditjen POM., 1995).

### 3.6.2 Pereaksi Mayer

Ditimbang 1,569 gram Raksa (II) klorida lalu dilarutkan dengan air suling hingga 60 ml. Pada wadah lain, ditimbang 5 gram kalium iodide lalu dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kedua larutan dicampur, ditambahkan air suling hingga 100 ml ( Ditjen POM., 1995).

### 3.6.3 Pereaksi Bouchardat

Ditimbang iodide sebanyak 4 gram kemudian dilarutkan dengan air suling, lalu ditambahkan 2 gram iodium sedikit demi sedikit lalu dicukupkan dengan air suling hingga 100 ml ( Ditjen POM., 1995).

### 3.6.4 Pereaksi Dragendroff

Ditimbang bismut (III) nitrat sebanyak 8 gram, lalu dilarutkan dalam 20 ml asam nitrat pekat. Ditimbang 27,2 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 50 ml air suling pada wadah yang lain. Kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna.Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling hingga volume larutan 100 ml (Ditjen POM., 1979).

### Pereaksi Timbal (II) Asetat

Ditimbang sebanyak 15,7 gram timbal (II) asetat dan dilarutkan dalam air suling bebas CO2 hingga 100 ml (Ditjen POM., 1979).

### 3.6.6 Pereaksi Molish

Ditimbang sebanyak 3 gram α-naftol dan dilarutkan dalam asam nitrat 0,5N hingga 100 ml (Ditjen POM., 1979).

### 3.6.8 Pereaksi FeCl3

Ditimbang sebanyak 1 gram Besi (Ⅲ) klorida, kemudian dilarutkan dengan air suling di dalam labu tentukur 100 ml hingga tanda batas (Depkes RI., 1989).

### Pereaksi Liebermen Bouchard

Sebanyak 5 mL asam asetat anhidrida dicampur perlahan dengan 5 mL asam sulfat pekat dan ditambahkan etanol hingga 50 mL (Ditjen POM., 1979).

## Skrining Fitokimia

### 3.8.1 Pemeriksaan Alkaloid

Ditimbang sebanyak 0,5 gram sampel kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 ml air suling, lalu dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dipakai untuk percobaan berikut:

1. Diambil filtrat sebanyak 3 tetes lalu ditambahkan 2 tetes larutan Meyer maka akan terbentuk endapan berwarna putih atau kuning.
2. Diambil filtrat sebanyak 3 tetes lalu ditambahkan 2 tetes larutan Bouchardat maka akan terbentuk endapan berwarna coklat hitam.
3. Diambil filtrat sebanyak 3 tetes lalu ditambahkan 2 tetes larutan Dragendorff maka akan terbentuk endapan berwarna merah atau jingga. Pemeriksaan Alkaloid dinyatakan positif jika terjadi endapan paling sedikit dua atau tiga dari percobaan di atas ( Ditjen POM., 1995).

### Pemeriksaan Flavonoid

Ditimbang sampel sebanyak 0,5 gram kemudian ditambahkan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas lalu diambil 5 ml filtrat lalu ditambahkan serbuk magnesium 0,1 gram, 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol kemudian dikocok dan dibiarkan memisah. Pemeriksaan Flavonoid dinyatakan positif jika terbentuk warna merah kuning atau jingga pada amil alkohol (Depkes RI., 1989).

### 3.8.3 Pemeriksaan Tanin

Ditimbang sampel sebanyak 0,5 gram lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu direndam dengan 10 ml aquadest selama 30 menit, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian diencerkan dengan air sampai tidak berwarna.Diambil larutan sebanyak 2 ml lalu ditambahkan 1-2 tetes pereaksi FeCl3 1%.Pemeriksaan Tanin dinyatakan positif jika terbentuk warna biru atau hijau kehitaman (Depkes RI., 1989).

### 3.8.4 Pemeriksaan Saponin

Ditimbang 0,5 g sampel lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air suling panas, didinginkan kemudian dikocok kuatkuatselama 10 detik, akan timbul busa yang mantap tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Ditambahkan 1 tetes larutan asam klorida 2N. Pemeriksaan Saponin dinyatakan positif apabila buih tidak hilang ( Ditjen POM., 1995).

### 3.8.5 Pemeriksaan Steroid & Titerpenoid

Ditimbang sampel sebanyak 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lalu ditambahkan n-heksana sampai terendam, dibiarkan minimal 2 jam. Disaring lalu diambil 10 ml filtrat kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselin dan diuapkan sampai kering, sisa hasil penguapan ditambahkan pereaksi Lieberman-Bouchard (yaitu asam asetat anhidrida 3 tetes dan asam sulfat pekat 3 tetes).Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid dinyatakan positif jika terbentuknya warna ungu atau merah yang berubah menjadi biru-hijau (Depkes RI., 1989).

### Pemeriksaan Glikosida

Ditimbang 3 gram sampel lalu disari dengan 30 ml campuran etanol 96% dengan air (7:3) dan 10 ml asam klorida 2N kemudian direfluks selama 2 jam, didinginkan dan disaring untuk mendapatkan filtrat. Diambil 20ml filtrat lalu ditambahkan 25 ml aquadest dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M lalu dikocok dan didiamkan selama 5 menit lalu disaring. Dilakukan penyarian filtrat sebanyak tiga kali, tiap kali dengan campuran isopropanol dnn kloroform (2:3).Lalu ditambahkan natrium sulfat anhidrat kedalam semua sari dan diuapkan pada suhu 500C kemudian sisa penyarian dilarutkan dalam 2 ml metanol. Larutan ini digunakan untuk 0,1 ml larutan sampel dalam tabung reaksi dan diuapkan diatas pemanas. Ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes pereaksi Molish kedalam sisa, kemudian secara perlahan-lahan akan ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung untuk melihat hasil positif glikosida yaitu terbentuknya cincin berwarna ungu ( Ditjen POM., 1995).

## Formula Pembuatan Gel Antijerawat

### 3.9.1 Formulasi Gel

Gel dibuat dalam 3 formula dengan konsentrasi perasan bunga telang yang berbeda yaitu : 0% (F0) 1% (F1), 3% (F2) dan 5% (F3). Blanko pada penelitian ini yaitu 0% (F0).

**Tabel 3.1 Modifikasi formula gel perasan bunga telang**

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Konsentrasi (%b/b)** |
| **Bahan** | **Basis 0****(F0)** | **Basis 1****(F1)** | **Basis 2****(F2)** | **Basis 3****(F3)** | **Fungsi** |
| Perasan bunga telang | 0% | 1% | 3% | 5% | Zat aktif |
| Carbopol 490 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | Geling Agen |
| Propilenglikol | 25 | 25 | 25 | 25 | Humektan |
| Propil paraben | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | Pengawet |
| Metil paraben | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | Pengawet |
| TEA | qs | qs | qs | qs | Emulgator |
| Oleum rosae | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | Pewangi |
| Aquadest ad | 100 | 100 | 100 | 100 | Pelarut |

### Pembuat Gel Perasan Bunga Telang

Sebanyak 2 g karbopol 940 dikembang- kan dalam lumpang dengan aquadest panas sampai mengembang lalu di tambahkan metil paraben sebanyak 0,15 g dan TEA 3 tetes (M1). Dalam beaker glass, dimasukkan aquadest panas kemudian ditambahkan propilen glikol dan 0,15g propil paraben lalu di aduk hingga larut, setelah larut ditambahkan perasan bunga telang(M2). Kedalam M1 ditambahkan M2 lalu di gerus hingga homogen.Ditambahkan TEA lagi secukupnya lalu ditambahkan 1 tetes oleum rosae dan aquades sampai batas kalibrasi dan digerus kembali hingga homogen (Eka Putri, 2022).

## Uji Karakteristik Fisik Mutu Sediaan

### 3.10.1 Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan dengan cara mengamati pengamatan terhadap warna, bau, dan tekstur dari sediaan(Puspita, 2020).

### 3.10.2 Uji Homogenitas

Sebanyak 0,1 gram sediaan ditempatkan pada preparat kaca, kemudian kaca bagian atas direkatkan hingga terbentuk lapisan tipis kemudian diamati(Puspita, 2020).

### Uji Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer Brookfield. Gel dimasukkan ke dalam wadah, kemudian spindel ukuran 2 dipasang pada viskometer dan rotor diputar dengan kecepatan 30 rpm(Rambe, 2022).

### 3.10.4 Uji pH

Pengukuran pH dilakukan terhadap sediaan gel yang telah dibuat sebelum dan sesudah kondisi penyimpanan. Pengukuran pH dilakukan Nilai pH idealnya harus sama dengan pH kulit atau tempat aplikasi. Ini untuk menghindari iritasi. PH normal kulit manusia berkisar antara 4,5–6,5 (Rambe, 2022).

### 3.10.5 Uji Daya Sebar

Uji dispersi gel menggunakan sampel gel sebanyak 0,5 gram diletakkan di atas gelas berbentuk bulat dengan diameter 15 cm, diletakkan satu gelas lagi di atas gel dan dibiarkan selama 1 menit. Diameter sebaran gel diukur dengan mengambil diameter rata-rata dari beberapa sisi, kemudian ditambahkan beban 50 g, 100 g, 150 g, 200 g pada kaca sebagai beban tambahan.Setiap beban tambahan didiamkan selama satu menit dan diameter sebaran diukur seperti sebelumnya (Rambe, 2022).

### 3.10.6 Uji Daya Lekat

Pengujian daya lekat dilakukan dengan cara gel diletakkan di atas dua kaca objek sebanyak 0,25 g, kemudian ditekan dengan beban 500g selama 5 menit. Setelah itu, kaca objek dipasang pada alat uji, kemudian dicatat waktu pelepasan dari kaca objek (Febriani, 2020).

### 3.10.7 Uji Stabilitas

Pengujian stabilitas dilakukan dengan metode *Cycling Test* dilakukan dalam 6 siklus. Dalam 1 siklus, sediaan (F0, F1, F2, F3) disimpan selama 24 jam di oven pada suhu 40±2 °C dan disimpan pada suhu 4±2 °C selama 24 jam. Uji dilakukan dalam 6 siklus. Stabilitas fisik dilihat perubahan fisik sediaan gel pada setiap siklus terhadap beberapa parameter pengamatan yaitu organoleptis, uji homogenitas, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat, dan uji pH(Puspita, 2020).

## Sterilisasi Alat dan Bahan

Media pertumbuhan disterilkan diautoclaf pada suhu 1210 C selama 15 menit dan alat-alat gelas disterilkan dioven pada suhu 160-1700 C selama 1-2 jam, kecuali untuk bahan yang terbuat dari karet disterilkan dengan cara direndam dalam alcohol 70% dan jarum ose disterilkan dengan cara flambir pada nyala bunsen (Irianto, 2006).

### 3.11.1 Pembuatan media Muller Hiton Agar (MHA)

Komposisi :

Beef infusion 3,0 gram

Pati 1,5 gram

Bakto Agar 17 gram

Air Suling ad 1000 ml

Cara Pembuatan :

Sebanyak 38 gram media MHA dilarutkan ke dalam aquades steril sedikit demi sedikit.Kemudian dicukupkan volume hingga 1 L dan dipanaskan sampai terlarut sempurna.Media disterilkan dalam autoclave pada temperature 1210C selama 15 menit (Rankin, 2005).

### Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

**Komposisi :**

Beef extract 3 g

Pepton 5 g

Agar 12 g

Aquadest 1L

Nutrien agar sebanyak 23 gram dilarutkan dalam aquadest sedikit demi sedikit, kemudian volumenya dicukupkan hingga 1L dipanaskan sampai terlarut sempurna.Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Rankin, 2005).

### 3.11.4 Pembuatan Larutan NaCl 0.9%

**Komposisi :**

Natrium klorida 9,0 gram

Air suling ad 1000 ml

Cara Pembuatan :

Sebanyak 9 gram NaCl ditimbang dan dilarutkan dengan air suling,dimasukkan dalam labu tentukur 1000 ml sampai larut sempurna, ditambahkan air suling steril sampai garis tanda, dimasukkan kedalam erlenmeyer steril yang tertutup kemudian disterilkan kedalam autoclaf pada suhu 1210 C selama 15 menit ( Ditjen POM., 1995).

### Pembuatan suspensi bakteri Standar Mc. Farland

**Komposisi :**

Komposisi : Larutan asam sulfat 9,95 ml

 Larutan bariun klorida 0,05 ml

Cara Pembuatan :

Larutan asam sulfat 1% sebanyak 9,95 ml dicampurkan dengan larutan BaCl2 sebanyak 0,05 ml dalam erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai larutan keruh. Apabila kekeruhan suspense bakteri uji adalah sama dengan kekeruhan larutan standart McFarland 0,5 konsentrasi suspensi bakteri adalah 1,5x108 CFU/ml (Borges, 2004).

## Pembiakan Bakteri

### 3.12.1 Pembuatan Stok Kultur (Staphylococcus epidermidis)

Koloni bakteri diambil bakteri *staphylococcus epidermidis* diambil dengan menggunakan jarum ose, lalu ditanam pada media Nutrient Agar (NA) miring dengan cara nenggoreskannya dengan bentuk zig-zag. Media tersebut selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 36-37°C selama 18 -24 jam ( Ditjen POM., 1995).

### 3.12.2 Pembuatan Suspensi Staphylococcus epidermidis

BakteriStaphylococcus epidermidisdiambil dengan kawat osesteril. Kemudian disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan sama dengan larutan McFarland 0,5 (Silaban, 2009).

## 3.12.3 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan pewarnaan gram. Sediaan bakteri diambil dari stok kultur diletakkan diatas dengan kristal violet, dibiarkan dan ditetesi lugol. Dicuci dengan alkohol asam dan dibilas dengan air mengalir, kemudian di tetesi safranin. Dari bakteri ysng diwarnai , yang mehan warna ungu meskipun telah dicuci dengan alkohol yang telah dilakukan pewarnaan dengan zat warna safranin dan tetap berwarna ungu bakteri tersebut dinamakan gram positif. Sebaliknya bakteri yang tidak berwarna dan ketika diwarnai dengan zat gram negatif (Irianto, 2006).

## Pembuatan suspense Clindamycin

Pembuatan suspensi clindamycin ditimbang sebanyak 0,03g Clindamysin kemudian dicukupkan dalama 10 ml aquadest steril (Athaillah, 2020).

## Uji Aktivitas Antibakteri gel bunga telang

Pengujian aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan metode difusi terdiri dari 6 perlakuan , yaitu blanko, 3 konsentrasi gel perasan bunga telang (1%,3% dan 5%) dan kontrol negative (DMSO), kontrol positif (Klindamicin)***.*** Dimasukkan kedalam cawan petri, ditambahkan media MHA yang telah disterilkan sebanyak 15-20 ml kemudian dimasukkan kedalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Dipipetsebanyak 1 ml suspense bakteri kemudian di swab sespensi bakteri dengan cutton swab secara merata, Kertas cakram dicelupkan kedalam masing-masing konsentrasi sediaan gel perasan bunga telang dan kemudian diletakkan di atas permukaan agar. Kemudian semua cawan petri yang telah diberi perlakuan, di inkubasi kedalam inkubator pada suhu 370C selama 18-24 jam, kemudian di ukur daerah zona hambat dengan menggunakan jangka sorong (Silviana, 2020).Kemudian dilihat adanya zona hambatan dan diukur dengan menggunakan penggaris besar zona hambatnya. Zona hambat dihitung dengan cara mengukur diameter horizontal dan diameter vertikal darizona hambat yang terbentuk .Dilakukan 3 kali pengulangan.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri disimpulkan dari luasnya diameter zona hambat pertumbuhan bakteri, semakin besar zona hambatan pertumbuhan , maka semakin besar aktivitas antibakteri gel antijerawat.

## Pengukuran Zona Hambat Bakteri

Setelah diinkubasi selama 24 jam zona hambat diamati dengan cara mengukur daerah bening (diameter zona hambat) disekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (Afifi, 2018).

Keterangan Diameter Zona Hambat :

|  |  |
| --- | --- |
| Diameter | Zona Hambat |
| 5 mm | Lemah |
| 6-10 mm | Sedang |
| 10-20 mm | Kuat |
| ≥ 21 mm | Sangat Kuat |

(Kusuma I. N., 2021)