

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Pada penelitian uji efektivitas gel *hand sanitizer* kombinasi ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens L.*) dengan alkohol & triklosan secara *in vitro* serta menguji karakteristik sediaan gel *hand sanitizer* ekstrak etanol seledri (*Apium Graveolens L*) ini menggunakan desain penelitian eksperimental.

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu

Penelitian dimulai dari bulan Desember 2018 sampai dengan bulan Juni 2019.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

Variabel bebas	: konsentrasi ekstrak dalam gel <i>hand sanitizer</i> , konsentrasi triklosan
Variabel tergantung	: bakteri <i>Escherichia coli</i>
Variabel terkontrol	: Media NA, waktu inkubasi bakteri

2. Definisi Operasional

- a) Ekstrak etanol seledri adalah hasil ekstraksi seledri dengan menggunakan metode maserasi dalam etanol 96% selama 5 hari
- b) *Hand sanitizer* ekstrak etanol seledri adalah gel *hand sanitizer* ekstrak etanol seledri dengan konsentrasi 1%, 2% dan 4%
- c) Diameter zona hambat bakteri adalah area bening yang muncul di sekitar lubang sumuran.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan gel hand sanitizer ekstrak seledri adalah erlenmayer (Pyrex®), alumunium foil, gelas ukur (Pyrex®), batang pengaduk, pipet ukur, neraca digital (Mettler Toledo®), cawan petri, anak timbangan, water bath, cawan porselin, kertas saring, pH meter *indicator stick* (Mettler Toledo®), jangka sorong, jarum ose, tabung reaksi (Pyrex®), kaca preparat, mikropipet (Eppendorf®), bunsen, tisu, kapas, masker, sarun tangan, karet, autoklaf, inkubator, alat viskometer Merlin VR II (Rheosys), pot gel, mortir dan stamper.

2. Bahan

Apium graveolens L. , *Carbopol* (Brataco®), TEA (Brataco®), Gliserin (Brataco®), reagen-reagen skrining fotokimia, etanol 70% (Brataco®), Metil paraben (Brataco®), *Escherichia coli*, *nutrient agar*, NaCl, *hand sanitizer* (Dettol®), triklosan, alkohol 70% (Brataco®) dan Aquades.

E. Cara kerja

1. Perolehan Bahan Seledri

Seledri (*Apium graveolens L.*) diperoleh dari petani seledri yang ada di kota Yogyakarta, Indonesia.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman seledri (*Apium graveolens L.*) dilakukan di Laboratoium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan.

3. Pembuatan Ekstrak

Metode pembuatan ekstrak daun seledri adalah menggunakan metode maserasi. Maserasi dimulai dengan menimbang serbuk simplisia daun seledri (*Apium graveolens L.*) kemudian dimasukkan ke dalam bejana dan ditambahkan pelarut etanol 96%. Maserasi dilakukan selama 5 hari dan pada hari ketiga dilakukan remaserasi. Pada hari kelima disaring menggunakan kertas saring dan corong *Buchner* untuk memperoleh maserat. Hasil maserat tersebut kemudian diuapkan dalam *rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak kental kemudian dipanaskan diatas *waterbath*. Hasil ekstrak kental kemudian ditimbang.

4. Skrinning Fitokimia Ekstrak Seledri

Skrinning fitokimia yang meliputi identifikasi senyawa alkaloid, polifenol, tanin, flavonoid, seskuiterpen dan monoterpen, steroid dan triterpenoid, kuinon dan saponin dilakukan sebagaimana Kristianingsih dkk, (2018).

a. Uji Alkaloid

Ekstrak seledri 0,5 gram ditambahkan kloroform sebanyak 20 ml dan 5 mL amonia 25 % lalu digerus kuat dalam mortir hingga terbentuk lapisan dan kemudian disaring. Lapisan air ditetesi 2 tetes pereaksi Dragendroff atau Mayer. Jika lapisan air tersebut berubah warna menjadi oranye ketika ditetesi drgendorf atau berubah menjadai endapan putih ketika ditetsi pereaksi mayer maka ekstrak etanol daun seledri positif mengandung alkaloid (Kristianingsih dkk, 2018).

b. Uji Tanin

Ekstrak kental etanol seledri ditimbang sebanyak 0,5 gram. Kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades hangat dan saring. Diambil 5 ml larutan hasil saringan kemudian ditambahkan 2 tetes FeCl_3 1%. Jika adanya terbentuk warna hijau kehitaman maka positif mengandung senyawa tanin (Robinson, 1995).

c. Uji Flavonoid

Ditimbang ekstrak kental etanol seledri sebanyak 0,5 gram. Ditambahkan 25 ml aquades hangat kemudian aduk dan saring. Larutan hasil saringan diambil sebanyak 5 ml dimasukkan kedalam tabung kemudian tambahkan 2 ml etanol. Kemudian ditambahkan serbuk Mg 0,1 gram dan 5 tetes HCL pekat. Jika larutan terbentuk warna kuning, jingga hingga merah maka menandakan positif adanya flavonoid (Mustikasari dan Aryani, 2010).

d. Uji Saponin

Ekstrak daun seledri sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air panas sebanyak 10 ml kemudian dinginkan. Kocok dengan kuat selama 10 detik, lalu jika terbentuk buih sekitar 1 cm sampai 10 cm dan buih tersebut bertahan selama 10 menit setelah ditetesi HCL 2 N satu tetes menandakan positif saponin (Kristianingsih dkk, 2018).

e. Uji Glikosida

Ditimbang ekstrak kental etanol seledri sebanyak 0,5 gram. Uji glikosida dapat dilakukan dengan menggunakan reaksi Liebermann Burchard. Setelah itu ekstrak kental etanol seledri ditambahkan 5 ml asam asetat anhidrat P dan 10 ml H₂SO₄ pekat. Jika terbentuk warna biru atau hijau positif menunjukkan adanya glikosida (Kristianingsih dkk, 2018).

f. Uji Steroid dan Terpenoid

Ekstrak kental etanol seledri ditimbang sebanyak 0,5 agram. Kemudian ditetesi anhidrida asetat satu tetes H₂SO₄ pekat. Jika terbentuk warna biru maka menandakan adanya positif senyawa steroid sedangkan jika terbentuk warna merah maka menandakan adanya senyawa terpenoid (Kristianingsih dkk, 2018).

5. Formulasi Gel

Disiapkan mortir dan stamper. Ditimbang Carbopol 940 kemudian taburkan diatas aquades hangat dalam mortir diaduk sampai membentuk

massa gel. Ditimbang metil paraben dan kemudian larutkan dalam alkohol 70% aduk hingga homogen. Alkohol 70% diukur dan ditimbang triklosan campurkan kedalam mortir aduk hingga homogen. Ditimbang ekstrak kental etanol seledri 1%, 2% dan 4% kemudian dicampurkan kedalam mortir hingga homogen. Ditambah aquades sampai 50 ml dan diaduk hingga homogen. Gel dimasukkan dalam wadah (pot gel) kemudian dievaluasi.

Tabel 3. Formula Gel Ekstrak Etanol Seledri

Nama Bahan	Penimbangan			Fungsi
	Formula I	Formula II	Formula III	
Ekstrak Seledri (%)	1%	2%	4%	Bahan aktif
Triklosan (%)	1%	0,5%	0,25%	Bahan aktif
Alkohol 70 %	40%	40%	40%	Bahan aktif
Carbopol 940	0,5 gram	0,5 gram	0,5 gram	<i>Gelling agent</i>
TEA	q.s	q.s	q.s	<i>Alkalizing agent</i>
Metil Paraben	0,1 gram	0,1 gram	0,1 gram	Pengawet
Gliserin	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	<i>Emollient</i>
Aquades	Ad 50 ml	Ad 50 ml	Ad 50 ml	Pelarut

6. Uji Kualitas Sediaan

Uji kualitas sediaan gel dilakukan untuk melihat apakah sifat atau karakteristik dari sediaan gel yang dibuat sudah sesuai standar yang ada seperti yang dilakukan oleh Kristianingsih dkk, (2018) :

a. Uji Organoleptis

Gel diamati secara visual atau secara langsung dengan panca indera untuk mengetahui kualitas sediaan gel dari segi warna, aroma dan bentuk sediaan.

b. Uji pH

Satu gram gel *hand sanitizer* ekstrak etanol seledri dalam 10 ml aquades. Diukur pH menggunakan pH meter.

c. Uji Evaluasi Daya Sebar

Sediaan gel ditimbang 0,5 gram dan diletakkan kaca berskala. Dibiarkan selama 1 menit. Diukur diameter gel yang menyebar. Dilanjutkan dengan tambahan beban 50 gram, 100 gram, 250 gram dan 500 gram.

d. Uji Acceptable (Kenyamanan)

Dilakukan dengan cara mengambil sedikit gel dan kemudian dioleskan pada tangan. (Kristianingsih dkk, 2018).

e. Uji Homogenitas

Sediaan gel diletakkan di kertas perkamen kemudian digosok (Kristianingsih dkk, 2018).

f. Uji Daya Rekat

Gel ditimbang 0,25 gram kemudian diletakkan diatas 2 obyek gelas berukuran 2x2 cm. Setelah itu ditimpa dengan beban 1 kg selama 5 menit. Gel dilepas beban 80 gram. Catat waktu pelepasannya dari gelas objek.

g. Uji Viskositas

Sediaan gel dimasukkan pada wadah *cup* hingga *bob* terendam dan dipasang pada instrumen. Alat yang digunakan adalah alat viskometer Rheosys Merlin VR II.

7. Persiapan Uji Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Sebelum penelitian alat-alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf pada suhu 121°C atau 1 atm selama 30 menit. Alat yang akan digunakan meliputi *erlenmeyer*, *petri disk* (cawan petri), *perforator*, dan tabung reaksi.

b. Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli*

Suspensi bakteri yang akan dibuat harus sesuai dengan standar Brown III CFU/ml. Suspensi bakteri *Escherichia coli* diambil 1 ose menggunakan jarum ose steril kemudian dimasukkan kedalam larutan NaCl dan diaduk hingga homogen, kemudian diencerkan hingga sesuai dengan standar 10⁴ CFU/ml.

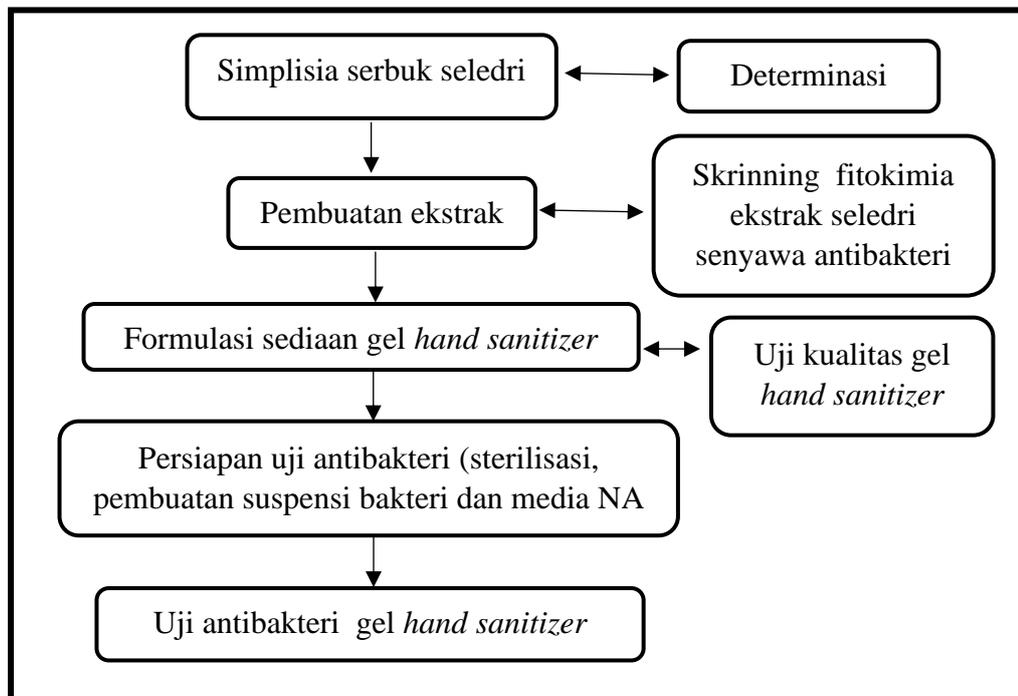
c. Pembuatan Media Nutrien Agar

- 1) Ditimbang Nutrien Agar 3,5 lalu dilarutkan dalam aquades 150 ml hingga homogen.
- 2) Larutan dipanaskan hingga mendidih dan larut. kemudian dihitung pH media = 6-7
- 3) Setelah itu larutan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama ± 15 menit. NA. Kemudian larutan dituangkan sama rata kedalam petridish yang sudah disediakan.

8. Uji Antibakteri

- a. Media NA yang sudah jadi dituangkan kedalam cawan petri yang sudah disediakan sama rata.
- b. Suspensi bakteri *Escherichia coli* yang sudah siap dituangkan ke dalam media NA yang sudah padat pada cawan petri.
- c. Dibuat sumuran pada tiap cawan petri dengan menggunakan alat pencandang/perforator.
- d. Tiap sumuran pada cawan petri diisi 0,1 ml sediaan gel ekstrak etanol seledri kombinasi triklosan (Formula I, Formula II dan Formula III), kontrol positif, dan kontrol negatif.
- e. Diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- f. Dihitung luas zona bening yang telah diperoleh.

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 3. Skema Langkah Kerja

G. Analisis data

Data evaluasi gel *hand sanitizer* dibandingkan dengan nilai rujukan standar gel. Hasil data zona hambat tiap formulasi dianalisis secara statistik menggunakan *one way* ANNOVA. Jika dari hasil uji ANOVA ditemukan adanya perbedaan yang signifikan antar formula maka dilanjutkan dengan *post hoc LSD* untuk melihat apakah ada perbedaan antar formula gel. Signifikansi hasil ditetapkan dengan $p < 0,05$.