

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai bulan November 2020. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Desember 2019 di Gunung Mangkol, Kabupaten Bangka Tengah, Provinsi Bangka Belitung. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Teknik, Laboratorium FPPB Universitas Bangka Belitung, dan Laboratorium Pangan BPOM Pangkalpinang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini seperti ayakan, oven, aluminium foil, timbangan analitik, blender, batang pengaduk, botol duran 500 mL, kertas saring, kapas, *rotary evaporator vacuum* merk Ika Rv 8 V, sonikator tipe *bath*, homogenizer digital merk DaIHAN HG-15D, jarum ose, pinset, pipet tetes, pipet micro, bunsen, peralatan gelas merk *pyrex*, jangka sorong, pengaduk *magnetic*, pengayak mesh 80, corong *buchner*, cawan petri, autoklaf, pipet tetes, pH meter, rak tabung reaksi, *wrapping*, shaker laboratorium, inkubator merk Memmert, sentrifus merk Universal 320, *microscope binocular* merk XSZ-107BN, dan spektrofotometer UV-Vis merk *Shimadzu*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini seperti daun kayu lubang kering, akuades, asam asetat glasial, aseton, ethanol 96%, DMSO (dimetil sulfoksida), metanol p.a, kloroform, kertas cakram, klindamisin, agar swallow, etil asetat, media NB (Nutrient Broth), larutan FeCl_3 1%, larutan HCl, larutan H_2SO_4 , larutan NaOH 10%, pewarnaan gram, serbuk Mg, reagen DPPH, pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, *Virgin Coconut Oil* (VCO), tween 80, bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Preparasi daun kayu lubang

Daun kayu lubang ini diperoleh dari Gunung Mangkol, Bangka Tengah. Kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari. Sampel yang telah kering diblender hingga diperoleh ukuran kecil dan diayak dengan mesh 80. Serbuk halus daun kayu lubang ditimbang 500 g dan di maserasi menggunakan pelarut aseton 5L selama 3 x 24 jam. Kemudian filtrat di evaporasi menggunakan *rotary evaporator vacuum* untuk memperoleh ekstrak pekat daun kayu lubang (Dungir *et al.*, 2012).

3.3.2 Skrining fitokimia ekstrak daun kayu lubang

Setelah diperoleh ekstrak pekat daun kayu lubang, kemudian dilakukan uji skrining fitokimia pada senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, dan tanin .

3.3.2.1 Alkaloid

Ekstrak daun kayu lubang dilarutkan dengan aseton dan masukkan ke dalam 3 tabung reaksi. Pada tabung reaksi tambahkan 10 tetes H_2SO_4 2 N dan dikocok. Kemudian pada masing-masing tabung reaksi tambahkan pereaksi, tabung pertama pereaksi Dragendroff, tabung kedua pereaksi Meyer, dan tabung ketiga pereaksi Wagner. Hasil positif apabila terbentuknya endapan yang mengidentifikasi adanya senyawa alkaloid. Pereaksi Dragendroff menghasilkan endapan berwarna merah jingga, pereaksi Meyer menghasilkan endapan putih, dan pereaksi Wagner menghasilkan endapan coklat (Mailuhu *et al.*, 2017).

3.3.2.2 Fenolik/Tanin

Ekstrak daun kayu lubang dilarutkan dengan aseton dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ke dalam tabung reaksi tambahkan 2-3 tetes $FeCl_3$ 1% dan dikocok. Hasil positif apabila menghasilkan warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Mailuhu *et al.*, 2017).

3.3.2.3 Flavonoid

Ekstrak daun kayu lubang dilarutkan dengan aseton dan masukkan ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama tambahkan 2 tetes HCl pekat dan dikocok. Selanjutnya ditambahkan serbuk Mg (magnesium) dan dikocok kuat. Hasil positif

menunjukkan terdapat busa dengan intensitas yang banyak dan larutan bewarna jingga (Mailuhu *et al.*, 2017).

3.3.2.4 Saponin

Ekstrak daun kayu lubang dilarutkan dengan aseton dan masukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ke dalam tabung tambahkan air panas dan terbentuknya busa. Hasil positif menghasilkan busa yang stabil selama 30 detik dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N (Roanisca, 2018).

3.3.3 Pembuatan nanoemulsi ekstrak daun kayu lubang

Berdasarkan Tabel 3.1 ekstrak daun kayu lubang di buat dalam konsentrasi 5% (5 gr ekstrak dalam 100 mL etil asetat).

Tabel 3.1 Formulasi nanoemulsi

Bahan	Formulasi nanoemulsi (50 mL)		
	Blanko	N1 (mL)	N3 (mL)
Ekstrak daun kayu lubang	-	1	3
VCO	3	3	3
Tween 80	12	12	12
Etanol 96%	3	3	3
Akuades	32	31	29

Larutan ekstrak 5% divariasasi konsentrasi dengan cara dipipet sebanyak (1 mL dan 3 mL) dalam fase minyak yaitu VCO, ditambahkan surfaktan yaitu tween 80 dan kemudian ditambahkan dengan kosurfaktan berupa etanol 96%. Setelah itu, campuran dilakukan pengaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* (3.500 rpm, 30 menit). Selanjutnya, ditambahkan akuades sedikit demi sedikit sampai campuran homogen (Hakim *et al.*, 2018). Setelah itu, campuran dihomogenkan dengan homogenizer (10.000 rpm, 30 menit) dan disonikasi menggunakan sonikator tipe *bath* selama 20 menit pada suhu 37°C sambil sesekali diaduk (Kumari *et al.*, 2018). Kemudian sediaan nanoemulsi yang diperoleh dievaporasi menggunakan *rotary evaporator vacuum*.

3.3.4 Uji evaluasi nanoemulsi ekstrak kayu lubang

1.3.4.1 Uji organoleptis

Pengujian yang diamati dari sediaan nanoemulsi ekstrak daun kayu lubang meliputi fase pemisahan, kejernihan, dan warna (Lawrence *et al.*, 2000).

1.3.4.2 Uji pH

Pengukuran pH sediaan menggunakan pH meter. pH sediaan nanoemulsi ini harus memenuhi kriteria pH kulit wajah pada rentang pH 5,4-5,9 (Rahmawanty *et al.*, 2015). pH meter dikalibrasi dengan larutan standar dapar pH 6,86 sebelum digunakan. Jika proses kalibrasi selesai maka akan tertera nilai pH standar dapar yang stabil. Kemudian, penentuan pH dilakukan pada suhu ruangan dengan mencelupkan pH meter ke dalam sampel dan nilai pH yang diperoleh dicatat.

1.3.4.3 Uji stabilitas fisik

Pengujian stabilitas fisik sediaan nanoemulsi dari masing-masing variasi konsentrasi dilakukan selama 15 menit pada kecepatan 4.000 rpm menggunakan sentrifus. Kemudian diamati dengan tidak terjadinya pemisahan pada kedua fase yang menandakan sediaan nanoemulsi tersebut stabil (Senapati *et al.*, 2016).

1.3.4.4 Pengujian persen transmittan

Sebanyak 10 mL sediaan nanoemulsi dimasukkan ke dalam kuvet yang telah dibersihkan dan nilai persen transmittan diukur pada panjang gelombang 650 nm dengan spektrofotometer UV-Vis dan metanol p.a digunakan sebagai blanko (Senapati *et al.*, 2016). Persentase sebesar 90%-100% menunjukkan persen transmittan sediaan yang memiliki penampakan visual yang transparan dan jernih (Costa *et al.*, 2012).

1.3.4.5 Uji viskositas

Viskositas diukur dengan viskometer *Ostwald*. Sebanyak 15 mL sediaan nanoemulsi dimasukkan ke dalam pipet viskometer *ostwald* menggunakan corong. Kemudian cairan dihisap menggunakan *pushball* sampai melewati dua batas. Lepaskan *pushball* sampai larutan melewati batas pertama dan siapakan waktu 30 detik untuk memulai hitungan sampai melewati batas kedua. Kemudian hasil dicatat

dan uji viskositas dilakukan sebanyak 3 kali putaran. Rumus perhitungan viskositas yaitu:

$$\eta = \eta_0 \frac{t \cdot \Delta}{t_0 \cdot \Delta_0}$$

Keterangan:

η : viskositas sampel

η_0 : viskositas air (0,00899)

t : waktu sampel

t_0 : waktu air

Δ : massa jenis sampel

Δ_0 : massa jenis air

1.3.4.6 Pengukuran bobot jenis

Penentuan bobot jenis dilakukan sebanyak 1 kali pengukuran. Timbang piknometer kosong (a). Kemudian masukkan akuades ke piknometer sampai penuh dan timbang (b). Akuades dikeluarkan dan piknometer dibersihkan sampai kering. Masukkan sediaan nanoemulsi ke dalam piknometer dan timbang (c). Bobot jenis yang diperoleh dicatat. Rumus perhitungan bobot jenis menggunakan persamaan dibawah ini :

$$\Delta = \frac{c-a}{b-a}$$

Keterangan :

Δ : bobot jenis (gr/mL)

a : piknometer kosong (gr)

b : piknometer akuades (gr)

c : piknometer sediaan nanoemulsi (gr)

1.3.4.7 Uji ukuran droplet

Pengujian ukuran droplet nanoemulsi di Laboratorium ILRC UI, Depok, Jawa Barat dengan menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*) tipe Horiba scientific SZ-100.

1.3.5 Pengujian antibakteri

1.3.5.1 Media agar miring

Sebanyak 50 mL larutan media dasar steril dimasukkan pada 5 tabung reaksi sebanyak 10 mL pada masing-masing tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil. Media agar miring dibiarkan memadat pada kemiringan 30° (Mujipradhana *et al.*, 2018).

1.3.5.2 Media dasar

Ditimbang agar swallow 8 gr dan 4 gr NB (nutrient broth) dan masukkan ke dalam erlenmeyer. Tambahkan 500 mL akuades, aduk hingga homogen menggunakan batang pengaduk sambil dipanaskan hingga larutan mendidih. Kemudian media dasar disteril menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya masukkan media dasar ke dalam cawan petri steril (Mujipradhana *et al.*, 2018).

1.3.5.3 Pembuatan suspensi bakteri uji

Masing-masing bakteri uji diambil 1 ose menggunakan jarum ose steril dan masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NB (nutrient broth) yang telah disterilkan. Setelah itu suspensi bakteri uji dihomogenkan dengan shaker laboratorium selama 1 x 24 jam hingga larutan keruh. Selanjutnya larutan suspensi bakteri dilakukan pengujian dengan menggunakan *microscope binocular* merk XSZ-107BN.

1.3.5.4 Inokulasi bakteri dari biakan murni bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus* masing-masing diambil 1 ose dengan jarum ose steril, bakteri dibiakkan dengan mengolesi bakteri secara zig-zag di media agar miring. Selanjutnya masukkan ke dalam inkubator untuk di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam (Dhuha, 2016).

1.3.5.5 Pembuatan larutan uji

3.3.5.5.1 Ekstrak

Larutan ekstrak ditimbang sebanyak 20 mg dan 60 mg dan larutkan ekstrak dengan larutan DMSO sebanyak 1 mL sampai homogen.

3.3.5.5.2 Nanoemulsi

Larutan nanoemulsi dipipet sebanyak 1 mL dari masing-masing sediaan nanoemulsi N1 dan N3. Sedangkan blanko sediaan nanoemulsi digunakan sebagai pembanding.

1.3.5.6 Pengujian aktivitas antibakteri

Larutan ekstrak dan nanoemulsi masing-masing dimasukkan kertas cakram steril. Kemudian, letakkan kertas cakram diatas media yang telah diolesi bakteri uji. Sebagai pembanding digunakan kontrol positif (klindamisin) dan kontrol negatif (DMSO). Setelah itu, masukkan ke dalam inkubator untuk di inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Untuk mengetahui zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

1.3.6 Pengujian antioksidan

1.3.6.1 Pembuatan larutan stok DPPH

Timbang 3,5 mg dan masukkan ke dalam labu ukur 35 mL, tambahkan metanol p.a sampai tanda batas, kemudian kocok larutan sampai homogen hingga diperoleh konsentrasi 100 ppm.

1.3.6.2 Pembuatan larutan stok uji

Sebanyak 1 mL masing-masing sediaan nanoemulsi N1 dan N3 dipipet, kemudian masing-masing sediaan nanoemulsi ditambahkan metanol p.a 10 mL. Sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm.

1.3.6.3 Pembuatan larutan blanko

Masukkan 1 mL DPPH ke dalam tabung reaksi dan tambahkan metanol p.a 4 mL, kemudian selama 30 detik dihomogenkan menggunakan vortex. Setelah itu, selama 30 menit inkubasi larutan pada suhu 37°C (Ningsi, 2018).

1.3.6.4 Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak daun kayu lubang

Larutan stok uji dipipet dengan variasi konsentrasi 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl, dan 50 µl, masukkan larutan masing-masing ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian tambahkan larutan DPPH 1 mL dan tambahkan metanol p.a sampai tanda batas. Kemudian campuran dikocok selama 30 detik menggunakan vortex dan inkubasi larutan selama 30 menit pada suhu 37°C hingga larutan mengalami perubahan warna

dari aktivitas DPPH. Sampel dilakukan duplo. Ukur larutan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm (Ningsi, 2018).

Persentase inhibisi diperoleh dari pengukuran absorbansi pada masing-masing larutan uji. Perhitungan persentase inhibisi dari aktivitas antioksidan dengan rumus (Sami *et al.*, 2019) :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi}_{\text{Blanko}} - \text{Absorbansi}_{\text{Sampel}}}{\text{Absorbansi}_{\text{Blanko}}} \times 100\%$$

Kemudian nilai IC_{50} ditentukan dengan rumus persamaan dari kurva regresi linier $y=ax+b$. Rumus perhitungan nilai IC_{50} yaitu dengan :

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b}$$

Keterangan :

y : % inhibisi (50)

x : Konsentrasi

a : slope (kemiringan)

b : intersep (perpotongan garis di sumbu Y)