

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, untuk mengetahui pengaruh variasi kadar polimer adhesive *Polivinil alkohol* 5%, 6%, 7% pada sediaan acne patch dengan kandungan Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau 6% peningkatan daya hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

4.2. Variabel Penelitian

4.2.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu perbedaan variasi kadar *Polivinil alkohol* sebagai polimer adhesive dengan konsentrasi 5%, 6%, dan 7%.

4.2.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu diameter zona hambat yang dihasilkan dari masing-masing formula.

4.3. Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1. Tempat Penelitian

Penelitian untuk uji antibakteri pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

4.3.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Agustus

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Bahan Aktif Penelitian

Bahan aktif yang digunakan pada penelitian ini adalah Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau yang diperoleh dari pembelian online (Tetes.atsiri) Kabupaten Bogor.

4.4.2. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus epidermidis*. Bakteri ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.3. Bahan Sediaan Formulasi *Acne patch*

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper betle* L.) (CV. Pavettia Wangi Atsiri), PVA Pharmaceutical Grade (Sigma),

Metil Paraben Pharmaceutical Grade (PT. Brataco), Propilenglikol Technical Grade (PT. Brataco), Etanol 95% Technical Grade (Medika), Aquadest Technical Grade (Hydrobatt), Adhesive Pharmaceutical Grade (Pharmacoll).

4.5. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan yaitu timbangan analitik (ACZET), beaker glass, batang pengaduk, waterbath (MEMMERT), pinset, cawan petri, cawan petri untuk uji antibakteri, dan pipet tetes.

4.6. Rancangan Formulasi

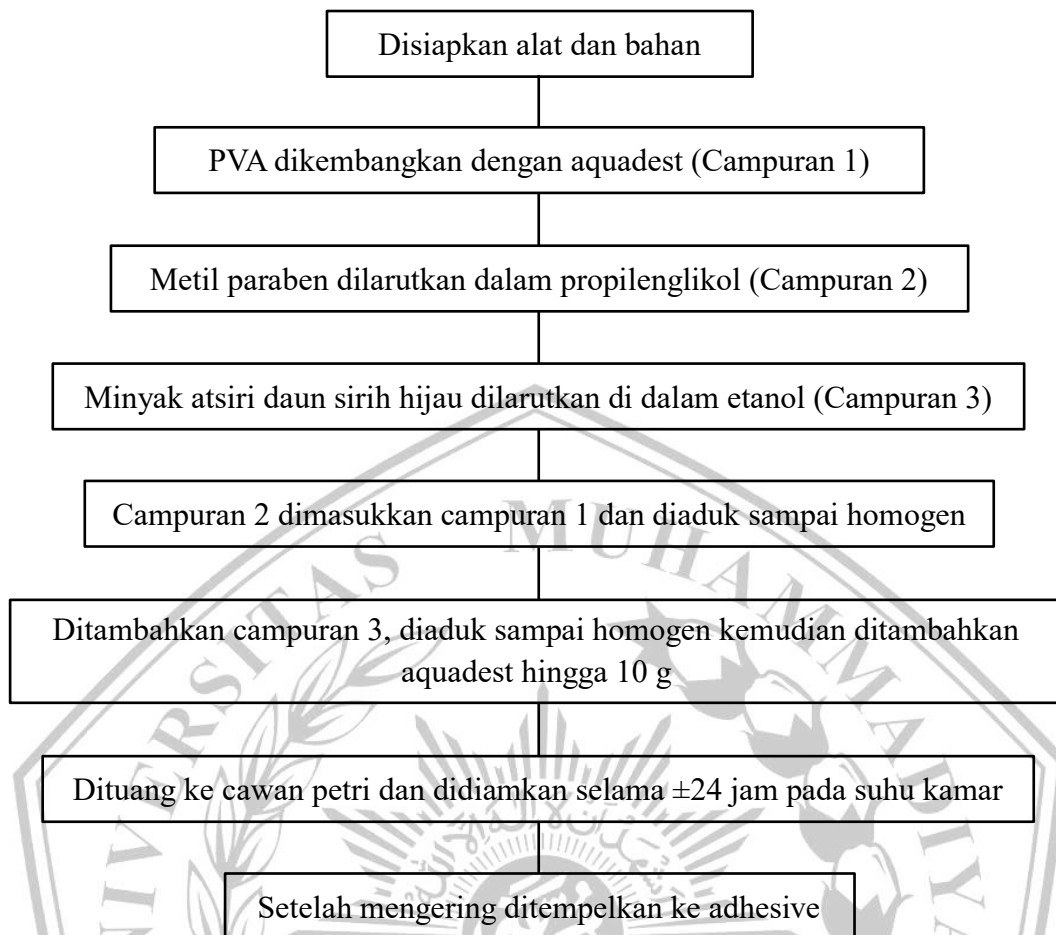
Tabel IV. 1 Formulasi *Acne Patch* minyak atsiri daun sirih hijau (*Piper betle L.*)

Bahan	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	Fungsi
Minyak Atsiri (<i>Piper betle L.</i>)	6	6	6	Zat Aktif
PVA	5	6	7	Basis
Metil paraben	0,3	0,3	0,3	Pengawet
Propilenglikol	10	10	10	<i>Penetration enhancer</i>
Etanol	40	40	40	Pelarut
Corrigen odoris	Qs	Qs	Qs	Pengaroma
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut
Adhesive	Qs	Qs	Qs	Plasticizer

Keterangan Adhesive : CMC (*Carboxymethyl Cellulosa, Polyisobutylene, Polyurethane Film*)

4.6.1. Cara Pembuatan *Acne Patch* Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper betle L.*)

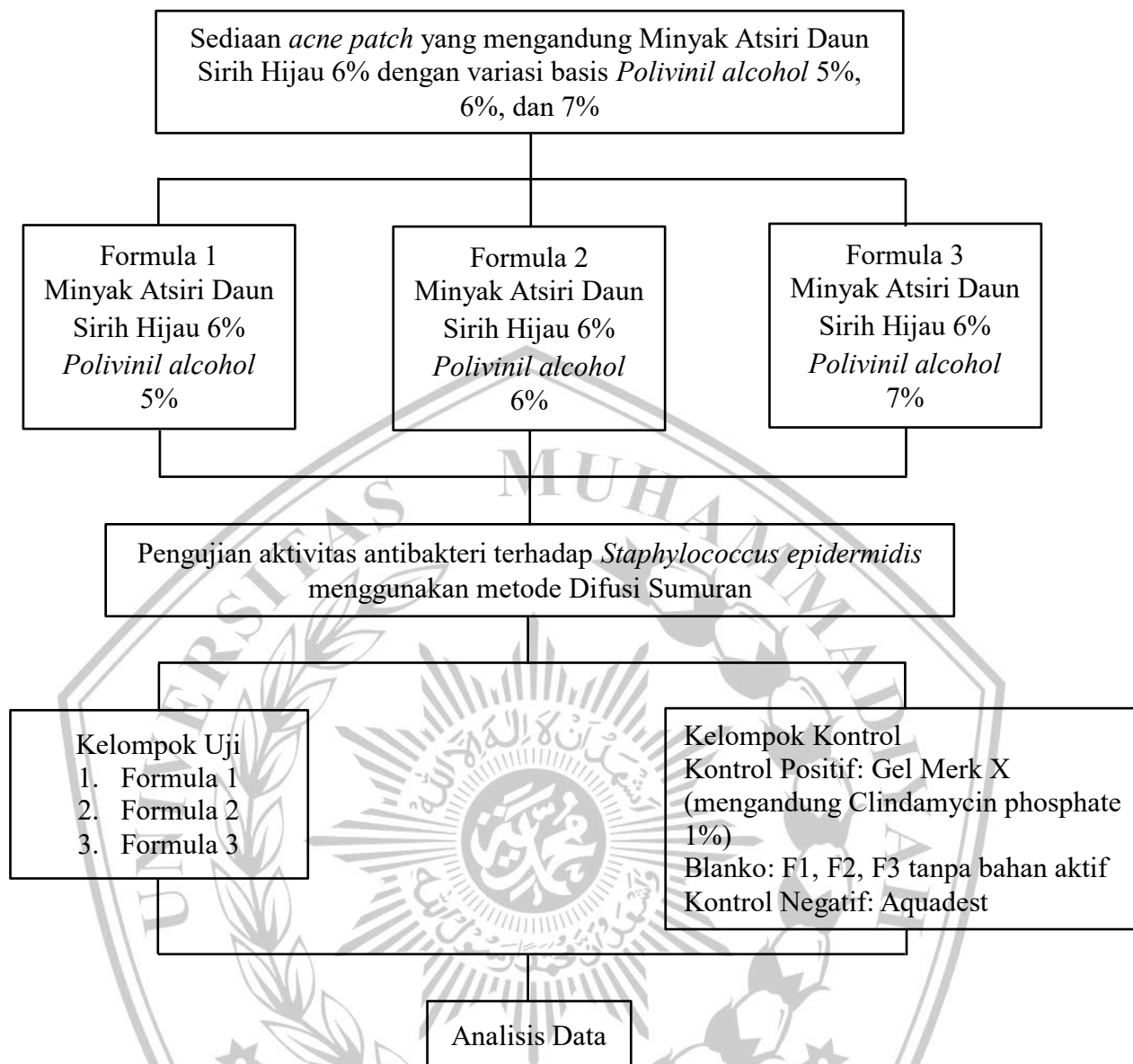
Basis PVA dicampurkan dengan aquadest kemudian dikembangkan dengan cara disteam menggunakan waterbath (Campuran 1). Pada wadah yang berbeda metil paraben dilarutkan dalam propilenglikol (Campuran 2). Minyak atsiri daun sirih hijau dilarutkan di dalam etanol (Campuran 3). Campuran 2 dimasukkan ke dalam campuran 1 diaduk sampai homogen. Campuran 3 ditambahkan, diaduk sampai homogen dan ditambahkan aquadest hingga 10 g. Selanjutnya campuran dituang ke dalam cawan petri dan didiamkan selama ± 24 jam pada suhu kamar. Setelah mengering sediaan ditempelkan ke adhesive.



Gambar 4. 1 Skema Pembuatan Acne patch

4.7. Metode Kerja

Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antibakteri acne patch Minyak Atsiri Daun Sirih dengan konsentrasi bahan aktif setiap formula sama yakni 6%. Setiap sediaan memiliki konsentrasi Polivinil alcohol yang berbeda-beda sebagai polimer adhesive. Pada penelitian ini menggunakan 3 formula. Kemudian dari 3 formula itu dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *S. epidermidis*. Formula 1 mengandung konsentrasi *Polivinil alcohol* 5%, formula 2 mengandung konsentrasi *Polivinil alcohol* 6% dan formula 3 mengandung *Polivinil alcohol* 7%.



Gambar 4. 2 Skema Pengujian Antibakteri

4.8. Uji Aktivitas Antibakteri

4.8.1. Sterilisasi Alat

Sebelum alat-alat dipergunakan harus disterilkan terdahulu. Untuk alat seperti gelas disterilkan mempergunakan oven yang bersuhu 170°C sepanjang 1 jam. Kemudian bagi media disterilkan mempergunakan autoklaf dalam suhu 121°C sepanjang 15 menit. Kemudian ose cukup disterilkan mempergunakan pemijaran nyala api Bunsen (Nazarudin *et al.*, 2019).

4.8.2. Peremajaan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Diambil sebanyak 1 ose bakteri menggunakan ose yang sudah disterilkan, kemudian digoreskan terhadap permukaan agar miring MHA dengan cara zig-zag dan diinkubasi pada suhu 37°C sepanjang 24 jam (Nazarudin *et al.*, 2019).

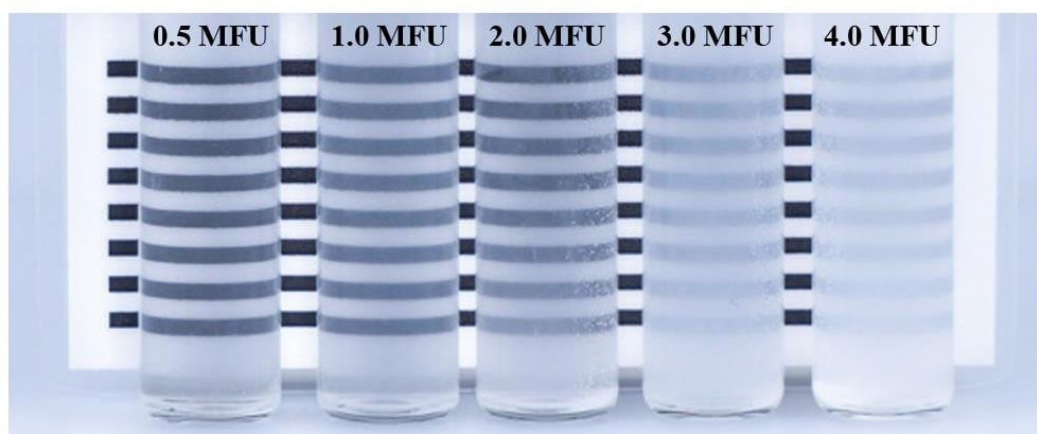
4.8.3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Sebanyak 1 ose bakteri *S. epidermidis* hasil peremajaan disuspensikan dalam 1 mL NaCl 0,9% dalam tabung reaksi steril. Kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 15 detik, dan diinkubasi sepanjang 24 jam pada suhu 37°C, selanjutnya dilihat kekeruhannya beserta melakukan perbandingan kekeruhan standar 0,5 McFarland (10-10/mL) setara dengan jumlah perkiraan suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Nazarudin *et al.*, 2019).

4.8.4. Pembuatan Larutan McFarland

Tabel IV. 2 Standar Larutan McFarland (Sagar Aryal, 2021)

Standar McFarland	1% BaCl ₂ (mL)	1% H ₂ SO ₄ (mL)	Perkiraan Kepadatan Jumlah Sel ($\times 10^8$ sel)
0.5	0,05	9,95	$1,5 \times 10^8$
1.0	0,1	9,9	$3,0 \times 10^8$
2.0	0,2	9,8	$6,0 \times 10^8$
3.0	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$
4.0	0,4	9,6	$12,0 \times 10^8$



Gambar 4. 3 Standar McFarland

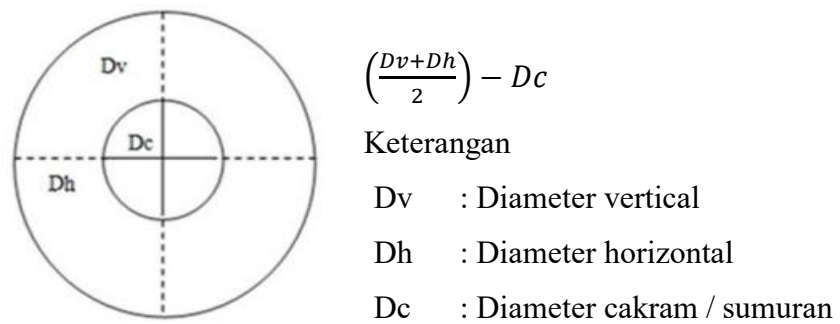
Larutan McFarland sebagai perbandingan kekeruhan secara visual pada pembiakan bakteri terhadap media cair beserta kepadatan $1,5 \times 10^8$ sel/mL dengan penyusunan seperti di bawah:

1. Disiapkan 1% larutan barium klorida anhidrat (BaCl_2) dan 1% larutan asam sulfat (H_2SO_4)
2. Gabungkan kedua larutan dan campur hingga membentuk suspensi keruh
3. Letakkan campuran ke dalam tabung bertutup ulir yang dilapisi aluminium foil
4. Tandai ketinggian cairan dan sebelum menggunakan pastikan tidak adanya penguapan
5. Simpan pada suhu kamar ($\pm 25^\circ\text{C}$)
6. Bandingkan kekeruhan suspensi bakteri dan tabung McFarland secara visual pada garis hitam putih. Jika suspensi terlalu keruh jadi bisa ditambahkan dengan aquadest dan jika kurang keruh dapat ditambahkan bakteri dengan jarum ose.

4.8.5. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilaksanakan menggunakan metode difusi sumuran. Tahap pertama, 3 mililiter larutan bakteri *S. epidermidis* diencerkan dua kali untuk mencapai konsentrasi 10^6 kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri. Cawan petri yang berisi suspensi diisi dengan 50 ml media MHA (Muller Hinton Agar). Campuran dikocok pada suhu hangat (maksimum 40°C) dan didiamkan selama 30 menit agar mengeras. Lubang berdiameter 5 mm dan tebal 0,5 cm dibuat pada media MHA menggunakan *cork borer*, banyaknya lubang disesuaikan dengan kebutuhan, dan 50 μl sampel uji kemudian ditambahkan ke dalam lubang tersebut. Setelah dua kali pengulangan dan inkubasi 24 jam pada suhu 37°C , zona bening yang terbentuk diukur (Yanti *et al.*, 2017)

Zona bening ini menunjukkan kepekaan bakteri terhadap sediaan patch yang memiliki aktivitas antibakteri yang dilaporkan sebagai luas zona hambat. Dalam zona bening (clear zone) di sekeliling sumuran dilakukan pengamatan mempergunakan jangka sorong beserta ketelitian 0,01 mm. Selanjutnya diameter zona hambat bisa dihitung mempergunakan rumus:

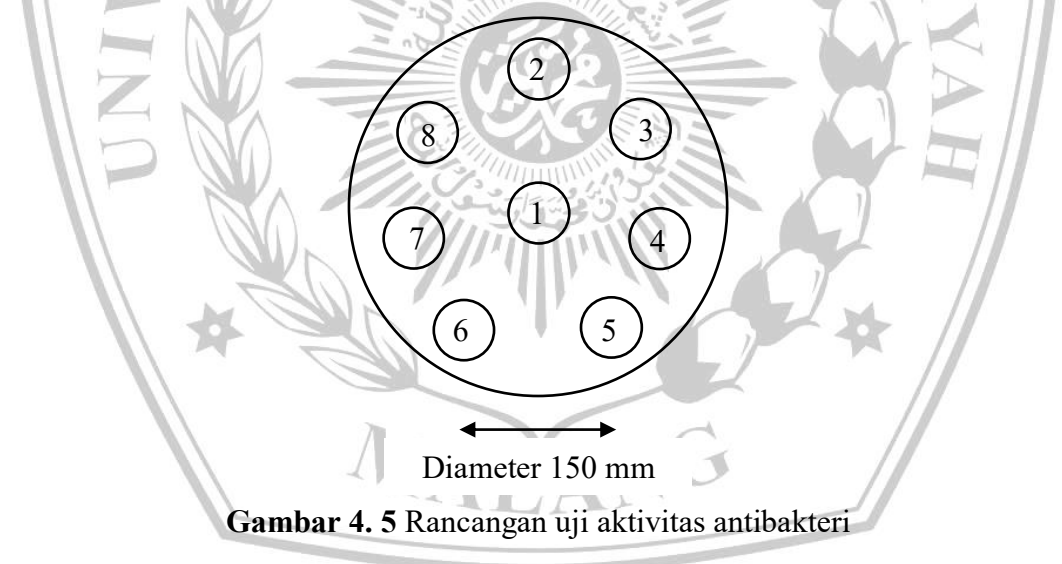


Gambar 4. 4 Diameter zona hambat

Diameter zona hambat memiliki sejumlah kategori yakni, lemah (≤ 5 mm), sedang (6-10 mm), kuat (11-20 mm), dan sangat kuat (≥ 21 mm) (Winastri *et al.*, 2020).

4.9. Kontrol Positif Antibakteri

Pada penelitian ini sediaan topical yaitu Gel Merk X yang berisi Clindamycin phosphate 1% digunakan sebagai kontrol positif. Tujuannya sebagai pembandingan dengan sediaan Acne patch minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. epidermidis*.



Keterangan:

- 1 : Kontrol Positif (Gel X dengan kandungan *Clindamycin phosphate* 1%)
- 2 : Formula 1 (Acne Patch *Polivinil alcohol* 5%)
- 3 : Formula 2 (Acne Patch *Polivinil alcohol* 6%)
- 4 : Formula 3 (Acne Patch *Polivinil alcohol* 7%)
- 5 : Blanko (Formula 1 tanpa Minyak Atsiri Daun Sirih)
- 6 : Blanko (Formula 2 tanpa Minyak Atsiri Daun Sirih)

7 : Blanko (Formula 3 tanpa Minyak Atsiri Daun Sirih)

8 : Kontrol Negatif (Aquadest)

4.10. Metode Analisis

SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) digunakan untuk menganalisis data yang didapatkan secara statistic untuk pengujian aktivitas antibakteri yang dalam bentuk data diameter zona hambat. Analisis data pada pemeriksaan karakteristik sediaan microgel digunakan metode *one-way anova* beserta taraf kepercayaan 95% maupun $\alpha = 0,05$. Guna mengetahui formula mana yang terdapat perbedaan bermakna bisa dilihat melalui harga P hitung. Jika P hitung < derajat kemaknaan 0,05 memperlihatkan terdapat perbedaan secara bermakna, kemudian dilanjutkan beserta uji *Honestly Significant Difference* (HSD) guna mengetahui data mana yang beda.

