

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Rancangan Penelitian**

Tujuan dari Penelitian ini untuk mengetahui pengaruh variasi kadar polimer adhesive *Polivinil alkohol* 5%,6%, 7% pada sediaan *acne patch* dengan kandungan Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau 6% terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### **4.2 Waktu dan Tempat Pelaksanaan**

Penelitian dilakukan pada tahun 2024 antara bulan Mei dan Juli. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

#### **4.3 Variabel Penelitian**

##### **4.3.1 Variabel Bebas**

Penelitian ini memiliki variabel bebas yaitu perbedaan variasi kadar *Polivinil alkohol* sebagai polimer adhesive dengan konsentrasi 5%,6% dan 7% pada sediaan *Acne Patch* Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper betle* L)

##### **4.3.2 Variabel Tergantung**

Diameter zona hambat yang dihasilkan dari masing-masing formula merupakan variabel tergantung dalam penelitian ini.

#### **4.4 Bahan dan Alat Penelitian**

##### **4.4.1 Bakteri Uji**

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian kali ini adalah *Staphylococcus aureus*, yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

##### **4.4.2 Bahan Sediaan Formulasi *Acne Patch***

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper betle* L) (CV. Pavettia Wangi Atsiri), PVA (Sigma), Metil Paraben (PT. Brataco), Propilenglikol (PT. Brataco), Etanol 95% (Medika), Aquadest (Hydrobatt), Adhesive (Pharmacoll).

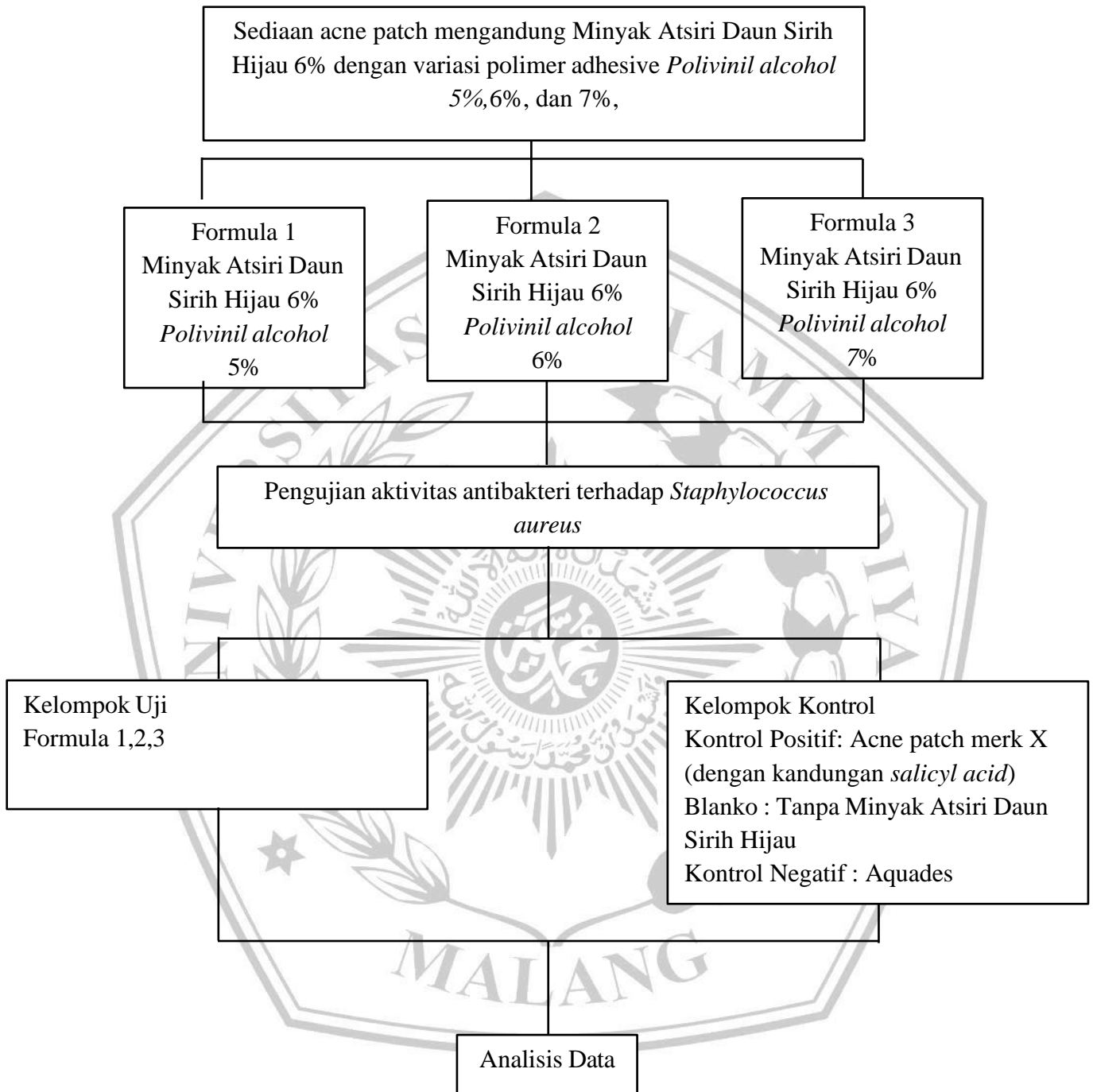
#### 4.4.3 Alat Penelitian

Peralatan yang dibutuhkan yaitu timbangan analitik (), beaker gelas (Pyrex), batang pengaduk (Onemed), waterbath () , pinset (Onemed), cawan petri (Onemed), cawan petri untuk uji antibakteri, dan pipet tetes (Onemed).

#### 4.5 Metode Kerja

Penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri acne patch dari kandungan Miyak atsiri daun sirih dengan konsentrasi bahan aktif setiap individu sama yakni 6%. Setiap konsentrasi pva yang berbeda-beda sebagai polimer adhesive. Pada penelitian ini menggunakan 3 formula, Kemudian dari 3 formula ini dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus*. Formula 1 mengandung pva dengan konsentrasi 6%, formula 2 dengan konsentrasi pva 7% dan formula 3 dengan konsentrasi pva 8%.





**Gambar 4. 1** Skema Kerja

#### 4.5.1 Rancangan Formulasi

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

Bahan	Fungsi	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Minyak Atsiri <i>Piper betle L</i>	Zat aktif	6	6	6
PVA	Basis	5%	6%	7%
Metil paraben	Pengawet	0,3	0,3	0,3
Propilenglikol	<i>Penetration enhancer</i>	10	10	10
Etanol 95%	Surfaktan	40	40	40
Corrigen odoris	Pengaroma	Qs	Qs	Qs
Aquadest	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100
Adhesive	Plasticizer	Qs	Qs	Qs

Komposisi Adhesive : CMC (Carboxymethyl Cellulosa, Polyisobutylene, Polyurethane Film)

#### 4.6 Pengujian Antibakteri

##### 4.6.1 Sterilisasi Alat

Instrumen perlu disterilkan sebelum digunakan. Untuk instrumen seperti peralatan gelas yang telah disterilkan dalam oven yang diatur pada suhu 170°C selama satu jam. Setelah itu, media di autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C untuk mensterilkannya. Ose disterilkan dengan api Bunsen hingga terdisinfeksi dengan baik (Nazarudin, 2019).

##### 4.6.2 Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Agar miring NA digunakan dalam peremajaan bakteri, di mana satu ose disterilkan dan kemudian dipanaskan. ditempatkan dalam pola zig-zag ke permukaan agar miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama satu hari penuh. (Nazarudin, 2019).

##### 4.6.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Dalam tabung reaksi, satu dosis bakteri *S.aureus* yang telah direvitalisasi disuspensikan dalam satu mililiter NaCl 0,9%. Setelah itu, tabung tersebut diaduk selama 15 menit untuk menghomogenkan, dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24

jam. Kekeruhan kemudian diamati; standar kekeruhan 0,5 Mc.Farland ( $10^5$ - $10^8$ /ml) setara dengan sekitar  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml dalam suspensi bakteri. (Nazarudin, 2019).

#### 4.6.4 Perlakuan

Suspensi dari bakteri *Staphylococcus aureus* dimasukan cawan berisi media agar NA dengan mengambil 100 ul kemudian ratakan dengan batang L. Cawan petri di buat 8 lubang sumuran menggunakan batang L, kemudian dimasukan kontrol uji (formula 1,2,3 acne patch), kontrol positif (Acne patch merk x), kontrol negatif 1 (Blanko F2 dengan tanpa Minyak Atsiri daun sirih), kontrol negatif 2 (Aquadex). Kemudian dimasukan kedalam lubang sumuran dengan menggunakan spatula logam. Tiga kali perlakuan ini diterapkan, diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Pada media, zona hambat yang berkembang dinilai. Dengan menggunakan jangka sorong, diameter zona horizontal dan vertikal diukur, dan zona rata-rata penghambatan digunakan untuk menghitung zona penghambatan.

#### 4.6.5 Pembuatan Larutan Mc.Farland

**Tabel IV. 2** Standar Larutan Mc.Farland (Mpila *et al.*, 2012.)

Nomor Tabung Koloni	BaCl <sub>2</sub> 1% (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% (ml)	Perkiraan Kepadatan Jumlah Sel ( $\times 10^8$ Sel)
0,5	0,05	9,95	1,5
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18

Larutan Mc.Farland sebagai perbandingan kekeruhan pembiakan bakteri terhadap media cair pada kepadatan  $1,5 \times 10^8$  sel/ml dengan urutan kerja :

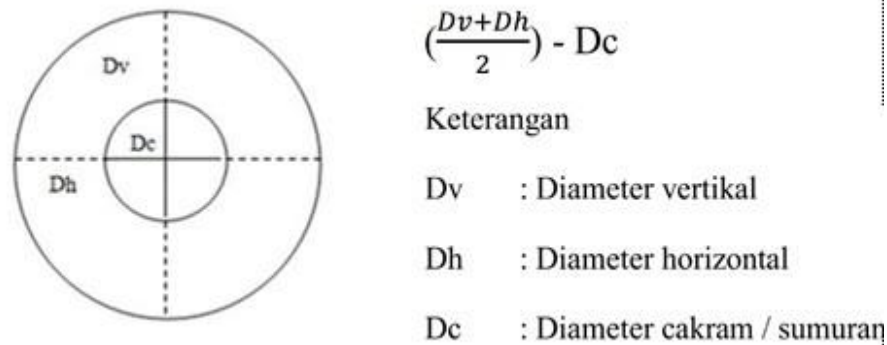
1. Diambil 0,05 ml *Barium Chlorida* (BaCl<sub>2</sub>) 1%
2. Diambil 9,95 ml Asam Sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1%
3. Dicampurkan pada tabung reaksi dengan perbandingan diatas

4. Disimpan larutan pada suhu kamar dalam kondisi gelap serta tidak terkena matahari langsung
5. Mengambil koloni bakteri *S.aureus* kemudian diencerkan aquadest secukupnya sampai larutan homogen
6. Membandingkan dengan larutan Mc.Farland dan jika biakan bakteri belum tampak sama dengan larutan pembanding, dapat ditambahkan aquadest. Apabila terlalu keruh dapat ditambahkan bakteri dengan jarum ose (Maciej *et al.*, 2020).

#### 4.6.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Dalam penelitian ini menggunakan metode sumuran, digunakan untuk mengukur penekanan pertumbuhan *S.aureus* dengan menggunakan batang pengukur. Setelah menghidupkan kembali bakteri *S.aureus*, suspensi dibuat. Minyak atsiri daun sirih dalam formulasi pelarut etanol 95% dengan konsentrasi tambahan 6%. Setelah menggabungkan larutan bakteri dengan komponen aktif, minyak atsiri daun sirih, larutan tersebut dihomogenisasi dan diberi waktu untuk memadat. Sepuluh mikroliter dari setiap konsentrasi larutan uji yang diperoleh, di tambahkan media agar, kemudian diletakkan pada media inokulum. Diinkubasi pada suhu 37°C selama satu hari penuh. Dengan menggunakan jangka sorong, zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran memungkinkan pengukuran pertumbuhan bakteri. Media agar yang diberi perlakuan (*Acne patch* Brand X) berfungsi sebagai kontrol positif dalam perbandingan ini, sedangkan formulasi tanpa komponen aktif berfungsi sebagai kontrol negatif (Octaviani *et al.*, 2019).

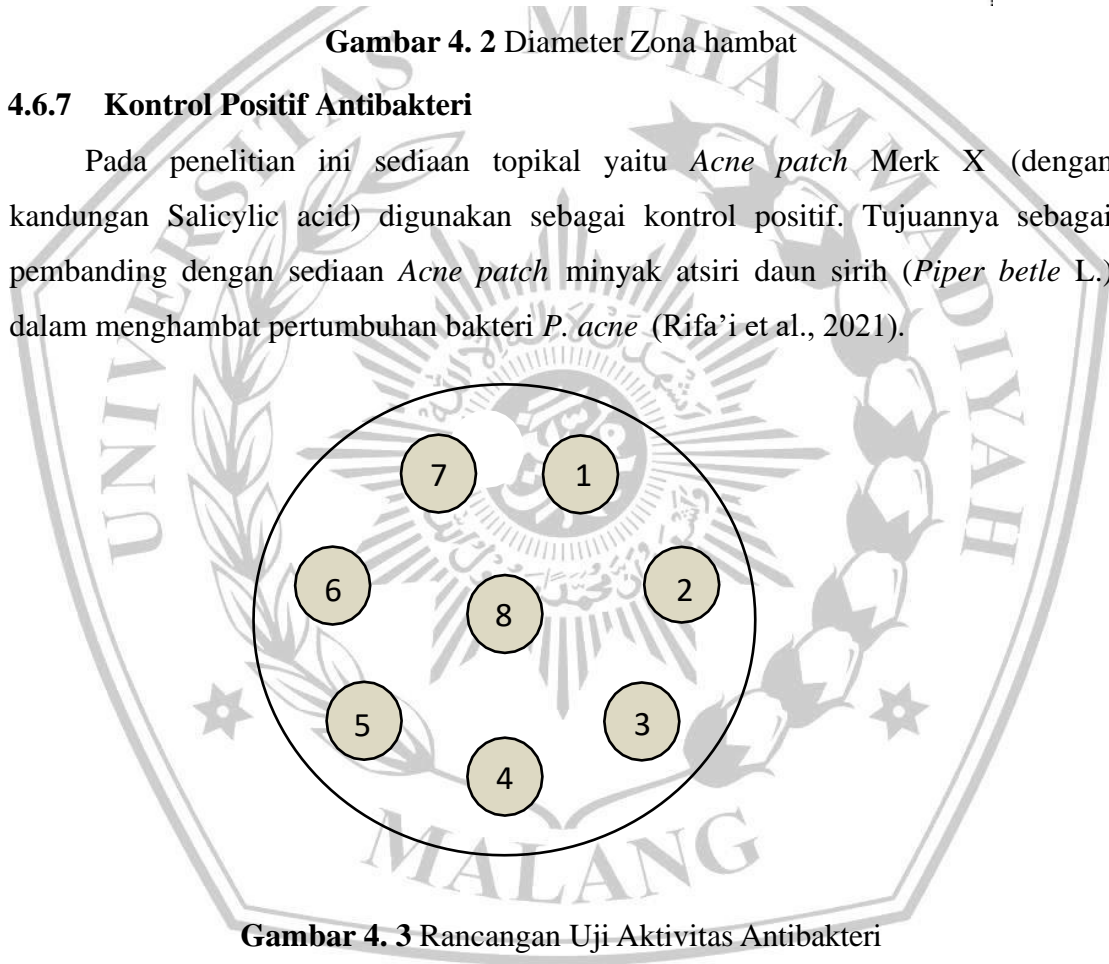
Sebagai area zona hambat, zona bening ini menunjukkan seberapa rentan bakteri terhadap sediaan *acne patch* dengan aktivitas antibakteri. Dengan menggunakan kaliper akurat 0,01 mm, pengamatan dilakukan pada zona bening yang mengelilingi sumuran. (Mozartha *et al.*, 2019). Selanjutnya diameter zona hambat dapat di hitung menggunakan rumus :



**Gambar 4. 2** Diameter Zona hambat

#### 4.6.7 Kontrol Positif Antibakteri

Pada penelitian ini sediaan topikal yaitu *Acne patch* Merk X (dengan kandungan Salicylic acid) digunakan sebagai kontrol positif. Tujuannya sebagai pembandingan dengan sediaan *Acne patch* minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. acne* (Rifa'i et al., 2021).



**Gambar 4. 3** Rancangan Uji Aktivitas Antibakteri

Keterangan:

- 1 : Formula 1 (*Acne patch* Polivinil alcohol 5%)
- 2 : Blanko (Formula 1 tanpa Minyak Atsiri Daun Sirih)
- 3 : Formula 2 (*Acne patch* Polivinil alcohol 6%)

- 4 : Blanko (Formula 2 tanpa Minyak Atsiri Daun Sirih)
- 5 : Formula 3 (*Acne patch Polivinil alcohol 7%*)
- 6 : Blanko (Formula 3 tanpa Minyak Atsiri Daun Sirih)
- 7 : Kontrol + ( Clindamycin 1% )
- 8 : Kontrol Negatif (Aquadest)

#### 4.7 Analisis Data

Untuk menilai secara statistik data diameter zona hambat yang dikumpulkan untuk pengujian aktivitas antibakteri, SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) digunakan Metode *one-way anova* digunakan untuk analisis data pada studi fitur sediaan *ance patch*, dengan tingkat kepercayaan 95% atau  $\alpha = 0,05$ . Dengan menggunakan harga P yang dihitung, dapat ditentukan formula mana yang memiliki perbedaan substansial. Uji *Honestly Significant Difference* (HSD) digunakan untuk menentukan data mana yang berbeda jika P hitung kurang dari 0,05, yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

