

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dari berbagai kandungan polimer *adhesive polivinil alkohol* (5%, 6%, dan 7%) pada sediaan *acne patch* yang mengandung 6% minyak atsiri daun sirih hijau terhadap penghambatan perkembangan bakteri *P. acne*.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

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

4.2.2 Variabel Tergantung

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

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

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

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan Aktif Penelitian

Penelitian ini menggunakan minyak atsiri daun sirih sebagai komponen aktifnya, yang dapat diperoleh dari pembelian online (CV. Pavettia Wangi Atsiri) Jawa Barat.

4.4.2 Bakteri Uji

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

4.4.3 Bahan Sediaan Formulasi *Acne patch*

Bahan yang digunakan untuk 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).

4.4.4 Alat Penelitian

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

4.5 Rancangan Formulasi

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

Bahan	Fungsi	F1 (%) (b/b)	F2 (%) (b/b)	F3 (%) (b/b)
Minyak Atsiri <i>Piper betle</i> L	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

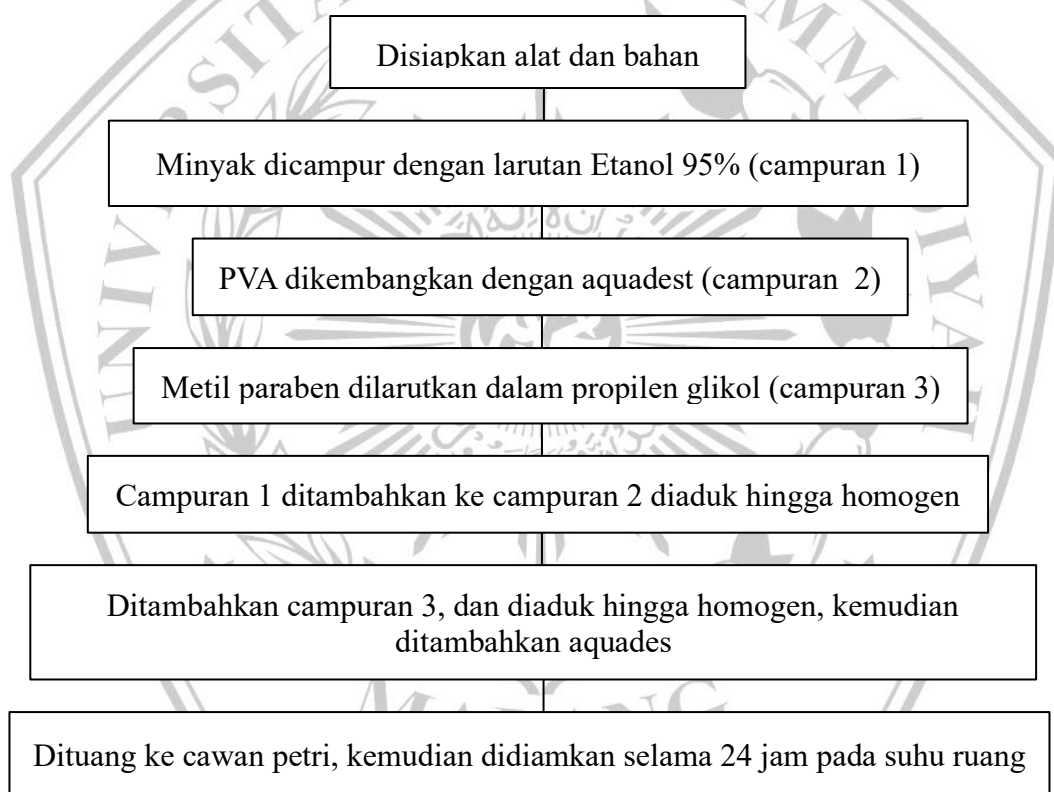
Keterangan Komposisi Adhesive : CMC (Carboxymethyl Cellulosa,

Polyisobutylene, Polyurethane Film

4.5.1 Cara Pembuatan *Acne patch* Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper betle* L.)

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Ditimbang Etanol 95% dan minyak atsiri daun sirih kemudian diaduk ad homogen (Campuran 1)

3. Ditimbang PVA dan diukur aquadest digunakan untuk membuat basis *acne patch*, dicampurkan dan di steam menggunakan waterbath tunggu sampai mengembang (Campuran 2)
4. Ditimbang Propilen glikol dan metil paraben dicampur aduk ad homogen dalam wadah terpisah (Campuran 3)
5. Setelah penambahan campuran 1, campuran 2 diaduk ad homogen.
6. Ditambahkan campuran 3 diaduk ad homogen, lalu tambahkan aquadest. Setelah itu didiamkan pada suhu ruangan selama kurang lebih 24 jam sebelum dipindahkan ke dalam cawan petri
7. Setelah mengering kemudian ditempelkan pada adhesive

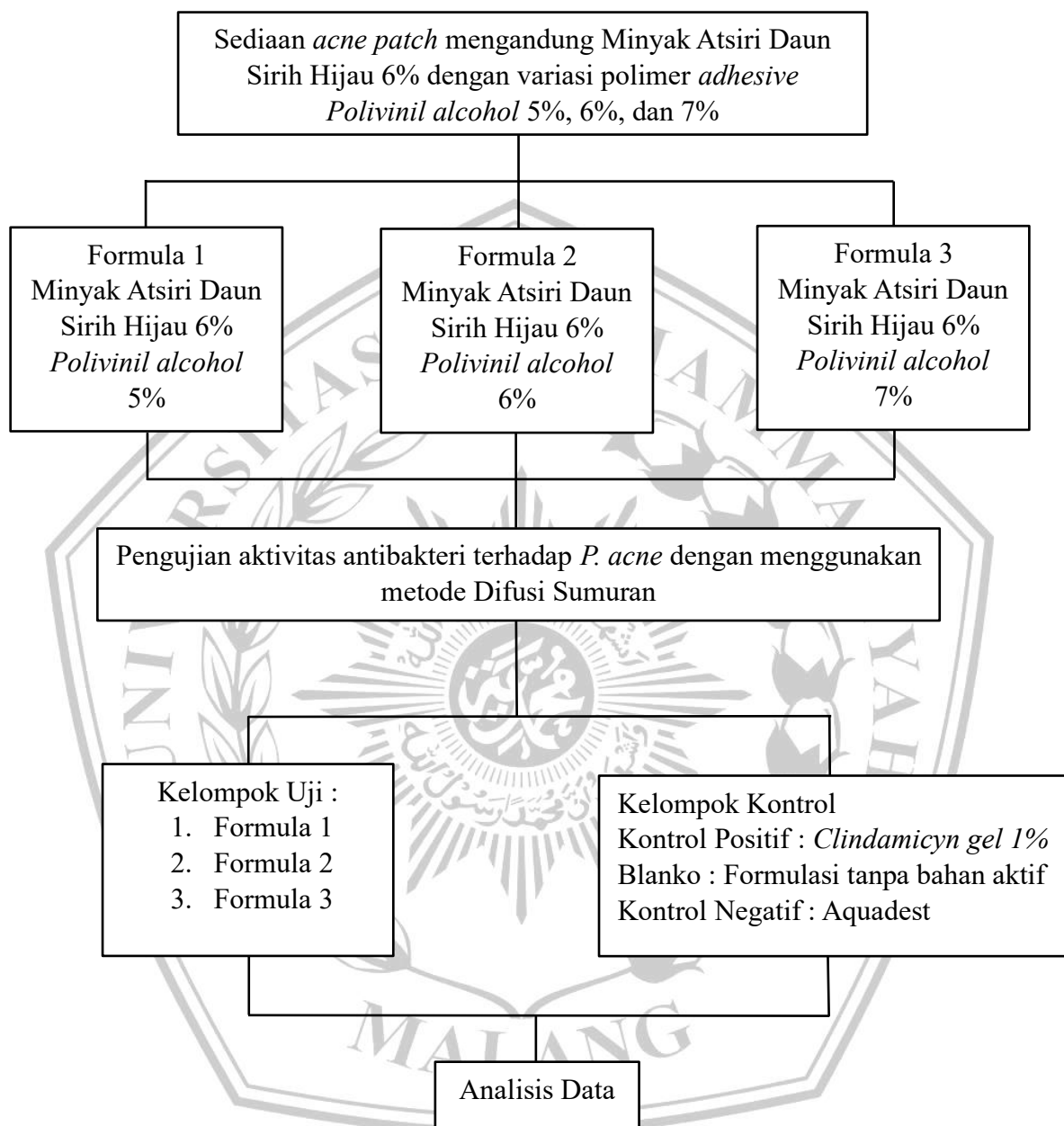


Gambar 4. 1 Skema Pembuatan *Acne patch*

4.6 Metode Kerja

Pada penelitian ini, *acne patch* minyak atsiri daun sirih dengan konsentrasi komponen aktif 6% pada masing-masing formula akan diuji aktivitas antibakterinya. 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 *P. acne*.

Formula 1 mengandung konsentrasi *Polivinil alcohol* 5%, formula 2 mengandung konsentrasi *Polivinil alcohol* 6% dan formula 3 mengandung *Polivinil alcohol* 7%.



Gambar 4. 2 Struktur Pengujian Antibakteri

4.7 Pengujian Antibakteri

4.7.1 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 *et al.*, 2019).

4.7.2 Peremajaan Bakteri *P. acne*

Setelah Media Hinton Agar yang sudah dibuat mengeras, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi media yang telah disiapkan kemudian dimiringkan. Setelah memadat 1 ose diambil untuk isolat mikroba uji *P. acne* dan ose bulat steril digunakan untuk menggores permukaan medium dengan cara zig-zag dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam Sampel kemudian diinkubasi selama dua puluh empat jam pada suhu 37°C dalam inkubator anaerob (Latif *et al.*, 2018).

4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *P. acne*

Dalam tabung reaksi steril, satu ose bakteri *P. acne* dari peremajaan disuspensikan dalam satu mililiter 0,9% NaCl. Setelah dihomogenisasi dengan vortex selama 15 detik, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kekeruhan kemudian diukur dengan membandingkannya dengan kekeruhan 0,5 standar Mc.Farland (10-10 / mL), yang kira-kira sama dengan 1,5 kali jumlah suspensi bakteri per mililiter. (Nazarudin *et al.*, 2019).

4.7.4 Pembuatan Larutan Mc.Farland

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

Nomor Koloni	Tabung	BaCl ₂ 1% (ml)	H ₂ SO ₄ 1% (ml)	Perkiraan Jumlah Sel (x10 ⁸ Sel)	Kepadatan
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 x 10⁸ sel/ml dengan urutan kerja :

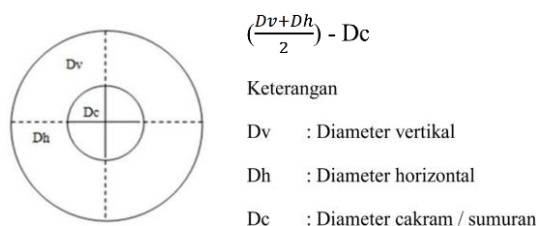
1. Diambil 0,05 ml *Barium Chlorida* (BaCl₂) 1%

2. Diambil 9,95 ml Asam Sulfat (H₂SO₄) 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 *P. acne* 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).

4.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Metode sumuran digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri setelah nilai kekeruhan ditentukan sesuai. Sebelum dipindahkan ke dalam cawan petri, larutan bakteri *Propionibacterium acnes* diencerkan untuk mencapai konsentrasi bakteri $1,5 \times 10^8$. Cawan petri yang berisi suspensi diisi dengan 50 ml media MHA (Muller Hinton Agar). Campuran tersebut dikocok pada suhu hangat (maksimum 40°C) dan didiamkan selama 30 menit agar mengeras. Lubang berdiameter 6 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 satu kali pengulangan inkubasi 24 jam pada suhu 37°C, zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong (Yanti *et al.*, 2017).

Zona bening ini menunjukkan kepekaan bakteri terhadap sediaan *acne patch* yang memiliki aktivitas antibakteri yang dilaporkan sebagai luas zona hambat. Dengan menggunakan jangka sorong dengan keakuratan 0,01 mm, pengamatan dilakukan di zona jernih yang mengelilingi sumur. (Mozartha *et al.*, 2019). Selanjutnya diameter zona hambat dapat dihitung menggunakan rumus :

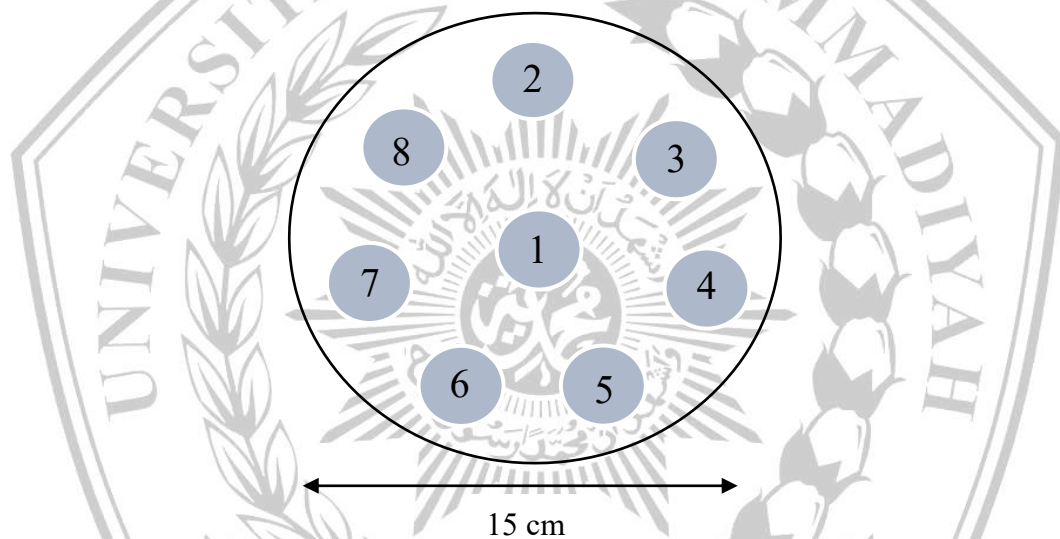


Gambar 4. 3 Diameter Zona hambat (Winastri *et al.*, 2020)

Diameter zona hambat memiliki beberapa kategori yaitu, lemah ($\leq 5\text{mm}$), sedang (6-10 mm), kuat (11-20 mm), dan sangat kuat ($\geq 21\text{ mm}$) (Winastri *et al.*, 2020).

4.7.6 Kontrol Positif Antibakteri

Pada penelitian ini sediaan antibiotik topikal yaitu gel Medi-Klin yang berisi *Clindamycin* gel 1% digunakan sebagai kontrol positif. Tujuannya sebagai pembandingan dengan sediaan *acne patch* minyak atsiri daun sirih dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Sediaan topikal MediKlin (*Clindamycin* gel 1%) sebagai kontrol positif menghasilkan diameter zona hambat sebesar 10,45 mm (10.000 ppm) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* (Rifa'i *et al.*, 2021)



Gambar 4. 4 Rancangan Uji Aktivitas Antibakteri

Keterangan:

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

4.8 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.

