

**BAB 4****METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain penelitian eksperimental.

Penelitian ini dilakukan dengan cara manipulasi variabel bebas yang kemudian diukur efeknya pada variabel terikat.

**4.2 Sampel Penelitian dan Pengulangan**

Jumlah pengulangan sampel dalam penelitian eksperimental dapat dihitung menggunakan rumus  $p(n-1) \geq 15$ . Dimana  $p$  adalah jumlah perlakuan, dan  $n$  adalah jumlah pengulangan dan nilai  $n$  harus bulat (Basuki, 2008). Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 6 perlakuan yaitu konsentrasi 5%, 7%, 9%, (untuk ekstrak kemangi maupun gel ekstrak kemangi). Sehingga perhitungannya:

$$p(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut dapat dikatakan bahwa jumlah pengulangan untuk masing-masing sampel adalah minimal 6 kali pengulangan.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi dua, yaitu:

##### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar ekstrak kemangi dan kadar ekstrak kemangi dalam sediaan gel. Konsentrasi ekstrak dan gel ekstrak kemangi yang digunakan adalah 5%, 7%, 9% dimana konsentrasi minimum kemangi dapat memberi efek antibakteri adalah 2-3%.

##### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah daya hambat ekstrak kemangi dan daya hambat sediaan gel ekstrak kemangi terhadap bakteri *Ps. aeruginosa*.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya untuk melakukan ekstraksi, Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya untuk melakukan pembuatan gel, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk melakukan pengujian daya hambat terhadap bakteri *Ps. aeruginosa*. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari 2015 hingga bulan Juni 2015.

## 4.5 Alat dan Bahan

### 4.5.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah toples kaca ukuran 1 liter, *rotary evaporator*, oven, *overhead* stirer, gelas ukur, gelas beaker, gelas arloji, labu ukur, mikropipet, pipet tetes, pH meter semisolid, timbangan digital, mortir, stamper, sendok tanduk, sendok stainless, cawan petri, cawan porselen, kaca preparat, batang pengaduk, kain flanel, pot gel, dan corong gelas.

### 4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk simplisia daun kemangi diperoleh dari Balai Materia Medika Batu, bakteri *Ps. aeruginosa* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi simplisia tanaman adalah etanol 70%. Formulasi gel yang digunakan adalah carbomer, *propylene glycol*, NaOH, dan aquades bebas CO<sub>2</sub>.

## 4.6 Definisi Operasional

- Bakteri *Ps. aeruginosa* adalah satu isolat dengan kode isolat 059-P dari spesimen pus kulit pasien terluka yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Serbuk simplisia daun kemangi diperoleh dari Balai Materia Medika Batu (Lihat Lampiran 9).
- Ekstrak kemangi yang diteliti adalah ekstrak dengan konsentrasi 5%, 7%, dan 9%.

- d. Gel ekstrak kemangi yang akan diteliti adalah gel ekstrak dengan konsentrasi 5%, 7%, dan 9%.
- e. Gel berbentuk semisolid artinya gel berbentuk tidak cair ataupun padat namun setengah padat.
- f. Ekstrak kemangi merupakan hasil ekstraksi serbuk simplisia daun kemangi dengan menggunakan metode maserasi dan pelarut etanol 70%.
- g. Metode pengujian aktivitas antibakteri kemangi terhadap bakteri *Ps. aeruginosa* menggunakan metode difusi sumuran.

#### 4.7 Prosedur Kerja

##### 4.7.1 Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak kemangi adalah metode maserasi. Metode ini dilakukan dengan cara serbuk simplisia daun kemangi diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan rasio perbandingan 1:5, yaitu serbuk ekstrak 200 gram, dan pelarut etanol 70% sebanyak 1 L, lalu diaduk dengan menggunakan *overhead* stirer sekali selama lima menit, kemudian direndam selama  $\pm$  24 jam, setelah itu disaring dengan kain flanel dan didapatkan maserat. Kemudian dilakukan remaserasi dilakukan sebanyak tiga kali, setelah itu maserat di evaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40 °C, kecepatan 70 rpm, dan dengan tekanan 15-20 Psi. Kemudian dioven pada suhu 40 °C untuk didapatkan ekstrak yang tidak mengandung etanol.

#### 4.7.2 Pembuatan Sediaan Gel

Pada penelitian ini akan dibuat gel tipe dua dan akan dibuat empat macam sediaan gel dengan konsentrasi ekstrak kemangi yang berbeda yaitu 0%, 5%, 7%, dan 9%. Dimana masing-masing gel akan dibuat sebanyak 20 gram. Berikut ini merupakan cara membuat sediaan gel:

1. Carbomer ditimbang kemudian didispersikan ke dalam sebagian dari total aquades bebas CO<sub>2</sub> sambil diaduk menggunakan stamper di dalam mortir.
2. NaOH ditimbang dan dilarutkan pada aquades bebas CO<sub>2</sub> sampai larut.
3. (1) dan (2) dicampur dan diaduk cepat menggunakan stamper sampai homogen dalam mortir.
4. Ekstrak yang telah ditimbang dilarutkan dalam sisa aquades bebas CO<sub>2</sub>.
5. (3) dan (4) dicampur dan diaduk sampai homogen.
6. Propilen glikol yang telah ditimbang dicampur dengan (5) sampai homogen di dalam mortir.
7. Gel yang telah jadi dimasukkan ke dalam pot gel.

**Tabel 4.1 Rancangan Formula Sediaan Gel**

Nama Bahan	Kadar Bahan	Jumlah untuk 20 gram	Fungsi
Ekstrak Kemangi	0%	0 gram	Bahan Aktif
	5%	1,1 gram	
	7%	1,54 gram	
	9%	1,98 gram	
Carbomer	2%	0,44 gram	Basis Gel
Propilen Glikol	15%	3,3 gram	Humektan, <i>Penetration enhancer</i>
NaOH	0,8%	0,176 gram	Pembentuk Gel
Aquades bebas CO <sub>2</sub>	ad hingga 100%	ad 20 gram	Pelarut

Keterangan: jumlah bahan dalam gel 20 gram dilebihkan masing-masing 10%

Spesifikasi yang diinginkan dari sediaan adalah gel berwarna bening kehijauan, tidak berbau, dan berbentuk agak padat. Gel juga dapat merata dalam sebarannya, pH yang diinginkan dari sediaan ini adalah sekitar 4-7, gel homogen dengan distribusi partikel merata.

### 4.7.3 Evaluasi Sediaan

#### 4.7.3.1 Uji Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis meliputi pengamatan warna dan bau. Gel harus menunjukkan karakter yang sama berupa warna dan bau yang sama setelah penyimpanan dipercepat (Ida dan Noer, 2012).

#### 4.7.3.2 Uji Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan dengan satu gram sediaan gel diletakkan di atas kaca preparat selanjutnya ditutup dan diberi pemberat di atasnya hingga

bobot mencapai 500 gram, kemudian diukur diameter setelah 1 menit (Arikumalasari, 2013).

#### 4.7.3.3 Uji pH

pH sediaan diujikan menggunakan pH meter dengan cara mengkalibrasi alat terlebih dahulu menggunakan larutan pH netral, kemudian dicuci dengan aquades, lalu dikeringkan dengan kertas *tissue*. Kemudian elektroda dicelupkan, sampai alat menunjukkan pH konstan. Angka yang ditunjukkan oleh pH meter merupakan harga pH sediaan (Panjaitan, 2012).

#### 4.7.3.4 Uji Homogenitas Fisik

Sejumlah tertentu sediaan dioleskan pada kaca preparat kemudian ditutup, sediaan harus menunjukkan susunan homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Panjaitan, 2012).

#### 4.7.4 Pembuatan Sumuran

Pembuatan sumuran pada penelitian ini adalah dengan mencampurkan 100  $\mu$ L bakteri *Ps. aeruginosa* dengan 15 ml agar yang telah disterilkan dengan *autoclave*. Kemudian ditunggu hingga agar memadat. Setelah itu dilubangi media agar untuk tempat gel atau ekstrak.

#### 4.7.5 Uji Daya Hambat Ekstrak Kemangi dan Gel Ekstrak Kemangi terhadap Bakteri *Ps. aeruginosa*

##### 4.7.5.1 Kontrol Negatif

Kontrol negatif pada penelitian ini adalah medium agar yang diberi bakteri *Ps. aeruginosa* tanpa diberi perlakuan. Penelitian kontrol negatif dilakukan dengan cara 15 ml medium agar yang telah disterilkan dicampur

dengan 100  $\mu$ L bakteri *Ps. aeruginosa* kemudian ditunggu sampai agar memadat. Setelah memadat, agar dilubangi, tanpa diberi apapun di dalam lubang. Kemudian diinkubasi 24 jam dengan suhu 37°C, lalu diamati apakah ada perubahan atau tidak.

Kontrol negatif lain pada penelitian ini adalah medium bakteri yang diberikan gel tanpa ekstrak kemangi dan medium bakteri yang diberikan aquades. Penelitian dilakukan dengan cara 15 ml medium agar yang telah disterilkan dicampur dengan 100  $\mu$ L bakteri *Ps. aeruginosa* kemudian ditunggu sampai agar memadat. Setelah memadat, agar dilubangi, lalu dipipet gel tanpa ekstrak ke dalam lubang atau aquades. Kemudian diinkubasi 24 jam dengan suhu 37°C, lalu diamati daya hambat minimumnya.

#### 4.7.5.2 Perlakuan

Perlakuan pada penelitian ini adalah medium bakteri yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak kemangi, yaitu 5%, 7%, dan 9%. Penelitian dilakukan dengan cara 15 ml medium agar yang telah disterilkan dicampur dengan 100  $\mu$ L bakteri *Ps. aeruginosa* kemudian ditunggu sampai agar memadat. Setelah memadat, agar dilubangi, lalu dipipet masing-masing konsentrasi ekstrak ke dalam masing-masing lubang. Kemudian diinkubasi 24 jam dengan suhu 37°C, lalu diamati daya hambat minimumnya.

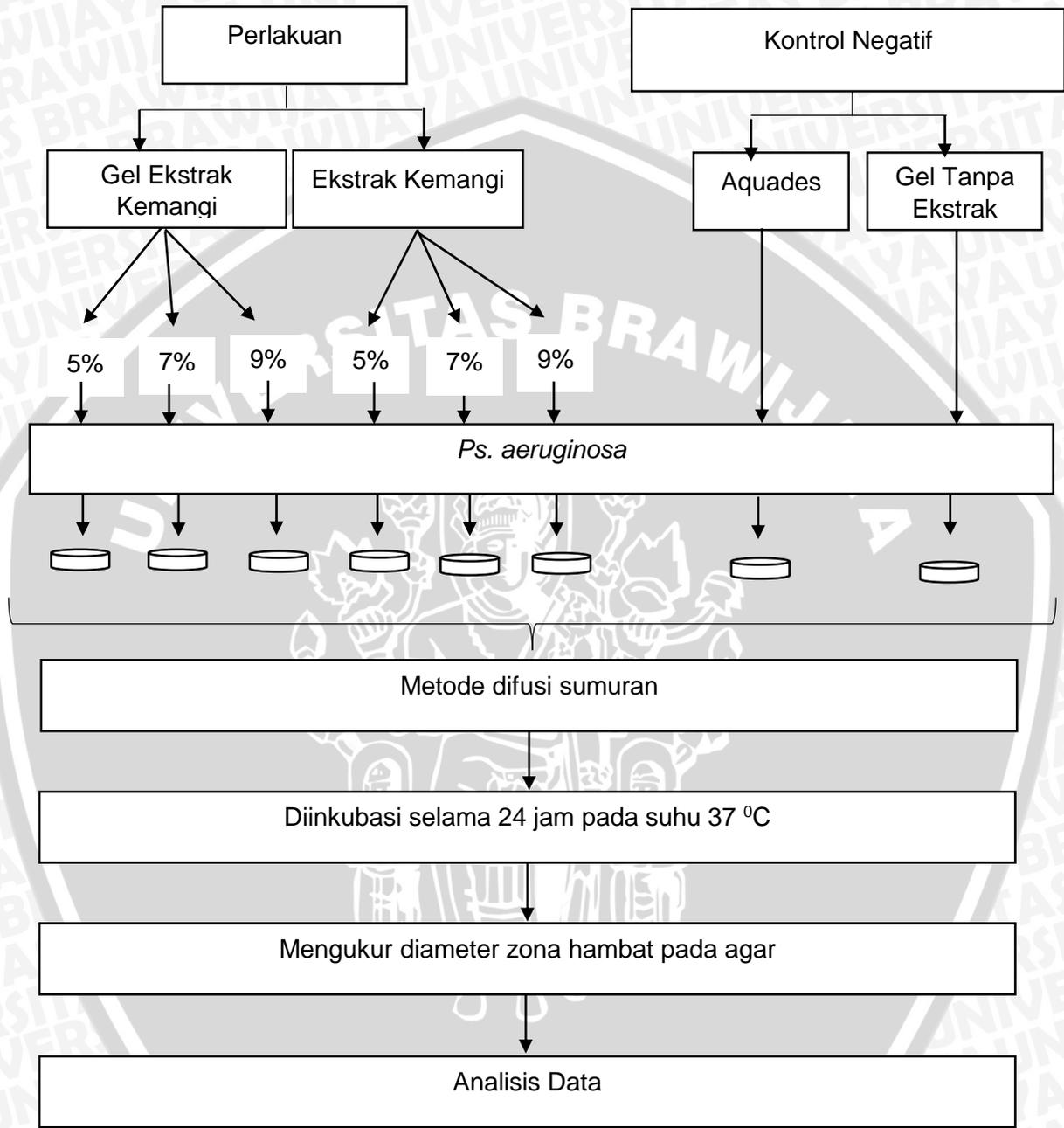
Kontrol perlakuan berikutnya adalah medium bakteri yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi sediaan gel ekstrak kemangi, yaitu 5%, 7%, dan 9%. Penelitian dilakukan dengan cara 15 ml medium agar yang telah disterilkan dicampur dengan 100  $\mu$ L bakteri *Ps. aeruginosa* kemudian ditunggu

sampai agar memadat. Setelah memadat, agar dilubangi, lalu dipipet masing-masing konsentrasi gel ekstrak kemangi ke dalam masing-masing lubang. Kemudian diinkubasi 24 jam dengan suhu 37°C, lalu diamati daya hambat minimumnya.

#### 4.8 Analisis Data

Analisis data pada penelitian akan diolah dengan metode uji statistik, yaitu menggunakan *One Way ANOVA*. Uji statistik menggunakan *One Way ANOVA* ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata antara ekstrak kemangi pada konsentrasi 5%, 7%, dan 9% dan perbedaan antara sediaan gel ekstrak kemangi pada konsentrasi 5%, 7%, dan 9% terhadap penghambatan bakteri *Ps. aeruginosa*. Sebelum melakukan *One Way ANOVA* dilakukan pemeriksaan syarat yaitu untuk  $\geq 2$  kelompok tidak berpasangan atau harus independen, dimana distribusi data harus normal dan varians data harus sama (Dahlan, 2013).

Selain itu juga menggunakan *Independent T-test* untuk mengetahui perbedaan antara ekstrak kemangi dibandingkan dengan sediaan gel ekstrak kemangi terhadap penghambatan bakteri *Ps. aeruginosa*. Taraf kepercayaan pada penelitian ini adalah 95%.



Gambar 4.1 Uji Aktivitas Antibakteri *Ps. aeruginosa*