

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan rancangan penelitian eksperimental *post test only control group design* dengan metode sumuran untuk mengetahui daya hambat sediaan gel ekstrak lidah buaya terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan sediaan gel dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk uji daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* pada bulan September 2014.

4.3. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian, dibagi menjadi dua, yaitu:

4.3.1. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

4.3.2. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah formula sediaan gel ekstrak lidah buaya konsentrasi 12,5%, 25%, dan 50%.

4.4. Pengulangan

Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat

dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001):

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan 3 konsentrasi dari ekstrak lidah buaya tanpa basis gel, 3 konsentrasi sediaan gel ekstrak lidah buaya, satu kontrol ekstrak dan satu kontrol gel ($p = 6 + 2 = 8$) maka didapatkan jumlah pengulangan:

$$8 (n - 1) \geq 15$$

$$8n - 8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 3$$

Jadi jumlah pengulangan yang perlu dilakukan pada penelitian ini adalah 3 kali.

4.5. Definisi Operasional

4.5.1. Daun lidah buaya yang digunakan berasal dari Materia Medika Batu, kota Batu. Daun lidah buaya yang digunakan adalah daun yang sudah masak dan berwarna hijau, yang diambil dari beberapa tanaman lidah buaya secara acak pada satu petak kebun lidah buaya dengan umur tanaman yang sama. Masing-masing tanaman lidah buaya diambil satu daun lidah buaya, kemudian daun tersebut digunakan sebagai bahan ekstrak.

4.5.2. Ekstraksi lidah buaya dilakukan dengan metode maserasi. Metode ini dilakukan dengan cara lidah buaya yang telah dipilih dan dipanen

dibersihkan dengan air bersih, kemudian dikeringkan. Pengeringan lidah buaya dilakukan dengan menggunakan oven selama 4 hari pada suhu 45⁰ C. Selanjutnya lidah buaya kering dihaluskan dan di ekstraksi dengan metode maserasi dengan etanol 95%, dengan perbandingan 1:5, kemudian direndam ± 3 hari, setelah itu disaring dengan kertas saring dan diperoleh maserat. Selanjutnya maserat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada kecepatan putar 60 rpm dan suhu 55⁰ C.

4.5.3. Isolat *Staphylococcus aureus* berasal dari swab tenggorok manusia yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5.4. Formulasi sediaan gel pada penelitian ini adalah menggunakan carbomer, trietanolamin (TEA), *butylated hydroxyanisole* (BHA), nipagin, dan aquades. Ada empat macam formula sediaan gel dan yang membedakan antar formula adalah kandungan ekstrak lidah buaya. Sediaan gel yang baik pada penelitian ini dinilai berdasarkan organoleptis, homogenitas fisik, daya sebar, pH sediaan, dan stabilitas fisik sediaan.

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1. Alat

Peralatan yang digunakan adalah *rotary evaporator*, oven, magnetic stirer, gelas ukur, gelas beaker, erlenmeyer, mikropipet, pipet tetes, kertas pH, timbangan digital, penangas air, mortar, cawan petri, dan gelas objek.

4.6.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah lidah buaya, *Staphylococcus aureus*, carbomer, trietanolamin (TEA), *butylated hydroxyanisole* (BHA), nipagin, etanol, dan aquades.

4.7. Prosedur Kerja

4.7.1. Pembuatan Ekstrak Lidah Buaya

Pembuatan ekstrak lidah buaya meliputi: daun lidah buaya yang telah di panen dicuci dan dikeringkan. Pengeringan daun lidah buaya dilakukan dengan menggunakan oven selama 4 hari pada suhu 45⁰ C. Daun lidah buaya yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan cara digiling hingga halus. Kemudian diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 95%, dengan perbandingan 1:5, yaitu 200g daun lidah buaya dan 1000ml etanol 95%. Kemudian direndam ± 3 hari, setelah itu disaring dengan kertas saring dan diperoleh maserat. Selanjutnya maserat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada kecepatan putar 60 rpm dan suhu 55⁰ C.

4.7.2. Pembuatan sediaan gel

Pembuatan sediaan gel meliputi: aquadest dipanaskan hingga mendidih. Kemudian nipagin dilarutkan dengan sejumlah aquadest dan diaduk hingga larut. Kemudian BHA dilarutkan dengan sejumlah aquadest dan diaduk hingga larut. Kemudian carbomer didispersikan ke dalam larutan nipagin dan diaduk hingga homogen. Kemudian ditambahkan larutan BHA dan diaduk hingga homogen. Kemudian ditambahkan TEA dan diaduk hingga terbentuk masa gel.

Prosedur tersebut diatas diulang untuk membuat sediaan gel ekstrak lidah buaya dengan konsentrasi 12,5%, 25%, dan 50% dengan menambahkan ekstrak lidah buaya pada masing-masing sediaan sebanyak 1,25ml ekstrak 100%, sediaan ini disebut sebagai sediaan dengan konsentrasi 12,5%. Selanjutnya ditambahkan 2,5ml ekstrak 100%, sediaan ini disebut sebagai sediaan dengan konsentrasi 25%. Selanjutnya ditambahkan 5ml ekstrak 100%, sediaan ini disebut sebagai sediaan dengan konsentrasi 50%.

Sebagai pembanding untuk aktivitas daya hambat juga dipersiapkan ekstrak lidah buaya tanpa basis gel dengan konsentrasi 0%, 12,5%, 25%, dan 50%. Pembuatan ekstrak lidah buaya tanpa basis gel meliputi: digunakan 1ml aquadest untuk ekstrak lidah buaya tanpa basis gel dengan konsentrasi 0%. Kemudian 0,125ml ekstrak 100% ditambahkan 0,875ml aquadest. Ekstrak ini disebut sebagai ekstrak lidah buaya tanpa basis gel dengan konsentrasi 12,5%. Kemudian 0,25ml ekstrak 100% ditambahkan 0,75ml aquadest. Ekstrak ini disebut sebagai ekstrak lidah buaya tanpa basis gel dengan konsentrasi 25%. Kemudian 0,5ml ekstrak 100% ditambahkan 0,5ml aquadest. Ekstrak ini disebut sebagai ekstrak lidah buaya tanpa basis gel dengan konsentrasi 50%..

4.7.3. Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan udara. Sesudah kering difiksasi di atas api bunsen. Kemudian sediaan dituangi kristal violet selama 1 menit. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air. Kemudian sediaan dituangi lugol selama 1 menit. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air. Kemudian sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.

Kemudian sediaan dituangi safranin selama 0,5 menit. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air. Selanjutnya dikeringkan dengan kertas penghisap, dan diamati dengan mikroskop.

4.7.4. Tes Katalase

Untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus* dilakukan uji katalase, yaitu dengan ditambahkan larutan H₂O₂ 3% pada perbenihan cair. *Staphylococcus* akan memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung udara.

4.7.5. Tes Koagulase

Untuk membedakan antara *S. aureus* dengan *Staphylococcus* yang lain adalah dengan menggunakan tes uji koagulase, yaitu suspensi bakteri diberi plasma, dinyatakan positif apabila plasma tersebut terjadi penggumpalan.

4.7.6. Uji Daya Hambat Bakteri dengan Metode Difusi Sumuran

Metode tes sensitivitas menggunakan difusi sumuran, dengan cara: membuat ekstrak lidah buaya tanpa basis gel dan sediaan gel ekstrak lidah buaya dengan konsentrasi 0%, 12,5%, 25%, dan 50%. Biakkan bakteri *S. aureus* dicampurkan dalam agar. Jumlah bakteri yang digunakan adalah 10⁸ cfu/mL. Kemudian dibuat sumur (*well*) pada media plate dengan diameter ± 6mm dengan jarak tertentu sebanyak 1 buah, diletakan ditengah plate. Kemudian ditambahkan ekstrak lidah buaya tanpa basis gel dan sediaan gel ekstrak lidah buaya pada masing-masing sumur yang telah diberi tanda. Kemudian dimasukkan plate tersebut ke dalam inkubator dan ditunggu selama 18-24 jam pada suhu 36-37°C. Akan nampak area sekitar sumur yang bersih/

tanpa koloni bakteri, yang disebut zona hambat. Dihitung diameter zona hambat.

4.7.7. Evaluasi Sediaan

a. Uji Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna dan bau yang diamati secara visual. Spesifikasi organoleptis sediaan adalah bentuk sediaan gel, berwarna kuning pucat, dan tidak berbau (Ditjen POM, 1995).

b. Uji Homogenitas Fisik

Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan 0,1 gram sediaan pada kaca transparan. Sediaan uji harus menunjukkan susunan yang homogen. Spesifikasi homogenitas sediaan adalah homogen dengan distribusi partikel merata (Carter, 1997).

c. Uji pH

Pemeriksaan pH menggunakan kertas pH dengan mencelupkan kertas pH ke dalam sediaan gel kemudian dicocokkan dengan pH indikator. Spesifikasi pH sediaan adalah 6 hingga 7.

d. Uji Daya Sebar

Gel hasil formulasi sebanyak 0,3 gram diletakkan dengan hati-hati di atas kaca transparan, lalu ditutup dengan kaca transparan lain yang sudah diketahui bobotnya. Kemudian dibiarkan sekitar 15 detik dan luas daerah yang diberikan oleh sediaan dihitung. Berikutnya dilanjutkan penambahan beban masing-masing 10, 20, 50, 100, dan 200 g dan dibiarkan selama 60 detik. Pertambahan luas yang diberikan oleh sediaan pada setiap

penambahan dihitung. Spesifikasi daya sebar sediaan adalah semakin luas daerah persebaran pada setiap penambahan beban maka mengindikasikan sediaan tersebut memiliki daya sebar yang baik.

e. Uji Stabilitas Fisik

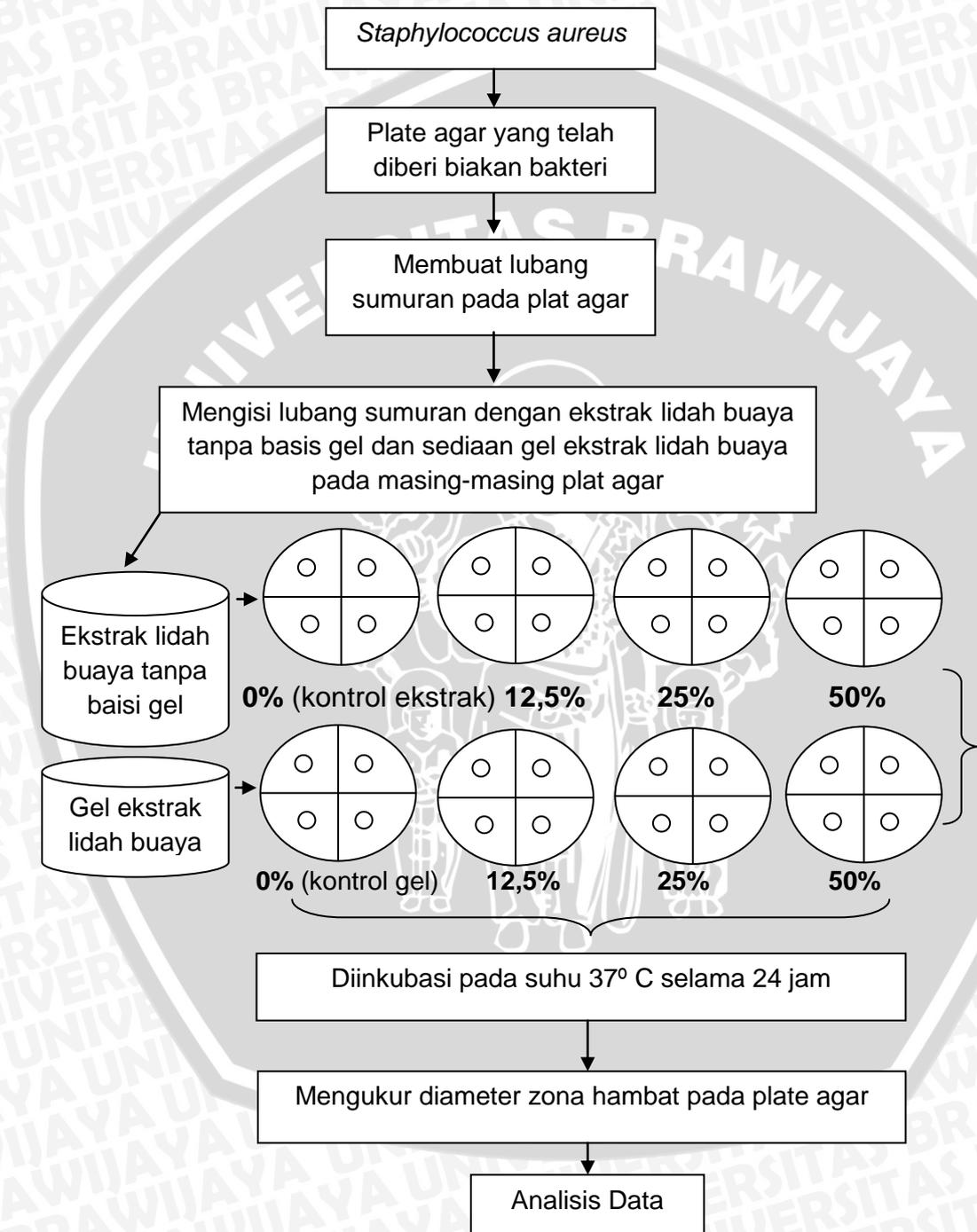
Sampel gel disimpan pada suhu kamar $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ serta suhu tinggi $40\pm 2^{\circ}\text{C}$. Pengamatan organoleptis, dilakukan setelah penyimpanan pada minggu ke-1, 2, 3, dan 4. Spesifikasi sediaan adalah stabil dalam berbagai suhu tanpa perubahan organoleptis.

4.8. Analisis data

Setelah dilakukan percobaan dengan 4 perlakuan pada ekstrak lidah buaya tanpa basis gel dan 4 perlakuan pada sediaan gel ekstrak lidah buaya serta 3 kali pengulangan, kemudian data-data hasil daya hambat terhadap bakteri *S. aureus* dianalisa dengan menggunakan uji statistik *Independent t-test*. Uji *Independent t-test* adalah metode yang digunakan untuk menguji kesamaan rata-rata dari 2 populasi yang bersifat independen, dimana peneliti tidak memiliki informasi mengenai ragam populasi, dengan kata lain populasi yang satu tidak dipengaruhi atau tidak berhubungan dengan populasi yang lain. Uji ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan penghambatan koloni bakteri *S. aureus* ekstrak lidah buaya dibandingkan dengan sediaan gel ekstrak lidah buaya.

4.9. Alur Kerja Penelitian

4.9.1. Uji Daya Hambat Bakteri



Gambar 4.1 Skema alur uji daya hambat ekstrak gel lidah buaya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

