

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental. Untuk mengetahui efek antibakteri sediaan gel ekstrak lengkuas dengan ekstrak lengkuas digunakan metode difusi sumuran pada medium agar padat.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk ekstraksi, Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan sediaan gel dan untuk uji daya hambat bakteri *S. epidermidis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari hingga bulan Juni 2015.

4.3 Jumlah Sampel

Jumlah pengulangan sampel dalam penelitian ini dapat dihitung menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$. Dimana p adalah jumlah perlakuan, dan n adalah jumlah pengulangan dan nilai n harus bulat. Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah empat konsentrasi gel ekstrak lengkuas dan empat

konsentrasi ekstrak lengkuas dengan konsentrasi 10%, 15%, 20% serta bakteri tanpa ekstrak (0%), sehingga perhitungannya (Basuki, 2008):

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Dengan demikian jumlah sampel 5 isolat *S. epidermidis* dengan masing-masing isolat berjumlah 10^8 CFU/ml, namun karena kurangnya ketersediaan isolat di laboratorium maka pada penelitian ini hanya menggunakan 3 isolat.

4.4 Variabel penelitian

Variabel dalam penelitian terbagi menjadi dua, yaitu:

a. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah daya hambat sediaan gel terhadap bakteri.

b. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sediaan gel ekstrak lengkuas dan ekstrak lengkuas dalam konsentrasi 0%, 10%, 15%, 20% berdasarkan uji eksplorasi sebelumnya.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Lengkuas

Rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) berupa serbuk diperoleh dari UPT Materia Medika Batu. Penanaman rimpang lengkuas dilakukan di Kota Batu, dengan masa panen 1 tahun.

4.5.2 Ekstrak lengkuas

Ekstrak etanol 70% lengkuas adalah ekstrak yang didapatkan dari ekstraksi serbuk lengkuas dengan menggunakan pelarut etanol 70% (etanol: air= 70:30). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:5, kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C (80-90rpm).

4.5.3 Bakteri

Bakteri uji *S. epidermidis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri yang digunakan diperoleh dari 3 isolat kulit (spesimen pus) yang berbeda yaitu *S. epidermidis* P- 6329 (Isolat A), *S. epidermidis* P-6308 (Isolat B), dan *S. epidermidis* P-6834 (Isolat C).

4.5.4 Amoksiklav

Amoksiklav adalah antibiotik dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Amoksiklav diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dalam bentuk cakram dengan dosis 30 µg. Amoksiklav digunakan sebagai pembanding dalam penelitian ini dikarenakan amoksiklav merupakan antibiotik yang pada umumnya digunakan dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus*.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Alat peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah toples kaca 1 L, *rotary evaporator*, overhead stirer, gelas ukur, gelas beaker, erlenmeyer, mikropipet, pipet tetes, pH meter semisolid, kaca preparat, kain flannel, mortar, stamper, cawan porselen, batang pengaduk, cawan petri, corong gelas, pot, timbangan digital, penangas air dan oven.

4.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*), bakteri uji *S. epidermidis*, etanol 70%, bahan formulasi gel terdiri dari carbomer, TEA, propilen glikol, dan aquades. Carbomer, TEA dan propilen glikol didapatkan dari PT. Panca Adi Aneka Kimia sebagai distributor.

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Pembuatan Ekstrak

Maserasi:

- 1) Disiapkan etanol 70%
- 2) Serbuk rimpang lengkuas direndam dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:5 yaitu serbuk ekstrak 100 gram dan pelarut etanol 70% 500 ml lalu diaduk dengan menggunakan *overhead stirer* sekali selama lima menit, kemudian direndam selama ± 24 jam.
- 3) Setelah direndam selama ± 24 jam, rendaman serbuk disaring dengan kain flanel dan didapatkan maserat.

- 4) Proses remaserasi dilakukan sebanyak enam kali.hingga maserat tidak berwarna. Remaserasi dilakukan agar mendapatkan flavonoid dalam jumlah banyak atau optimal.
- 5) Bagian yang larut dalam etanol 70%, diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C (80-90rpm).
- 6) Dikeringkan/ diuapkan menggunakan oven dengan suhu 40°C
- 7) Diperoleh ekstrak kental lengkuas.
- 8) Ditimbang dan dihitung rendemennya.

4.7.2 Pembuatan Sediaan Gel

- 1) Carbomer ditimbang dan dispersikan dalam aquades bebas CO₂ sambil dilakukan pengadukan cepat dengan mortar dan stamper.
- 2) TEA ditambahkan pada carbomer yang telah di dispersikan dalam aquades bebas CO₂ di dalam mortar, kemudian dicampur dengan menggunakan stamper secara perlahan sampai terbentuk masa gel.
- 3) Propilen glikol ditambahkan pada masa gel di dalam mortar, kemudian dicampur dengan menggunakan stamper hingga homogen.
- 4) Ekstrak yang telah didapatkan dari ekstraksi simplisia lengkuas sebelumnya, dilarutkan dalam aquades bebas CO₂ sesuai ukuran.
- 5) Larutan ekstrak ditambahkan pada masa gel di dalam mortar kemudian dicampur dengan menggunakan stamper hingga homogen.
- 6) Aquades yang telah diukur ditambahkan kedalam gel ekstrak kemudian diaduk hingga homogen.

Tabel 4.1 Rancangan Formula Sediaan Gel

Nama Bahan	Kadar	Jumlah dalam 20 gram (gram)	Fungsi
Ekstrak Lengkuas (<i>Alpinia galanga</i>)	0%	0	Zat aktif
	10%	2,04	
	15%	3,06	
	20%	4,08	
Carbomer	2%	0,408	Pembentuk gel
Propilen glikol	15%	3,06	Humektan dan <i>penetrating enhancer</i>
TEA	1%	0,22	<i>Alkalizing agent</i>
Aquades	ad 100%	ad 20	Pelarut

Keterangan : Hasil Jumlah bahan dalam gel 20 gram dilebihkan masing-masing 2%

Spesifikasi sediaan gel yang diinginkan yaitu gel berbentuk kental, berwarna coklat, tidak berbau, stabil dalam suhu ekstrem tanpa ada perubahan fisik dan kimia, dapat merata dalam sebarannya, gel mampu melekat dalam waktu yang optimal, memiliki pH yang 4.5- 7, dan homogen dengan distribusi partikel merata.

4.7.3 Evaluasi Sediaan

4.7.3.1 Uji Organoleptis

Tujuan:

Untuk mengetahui warna, bentuk, dan bau dari sediaan gel ekstrak

Lengkuas.

Metode:

Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna dan bau yang diamati secara visual.

Interpretasi Hasil:

Spesifikasi organoleptis sediaan adalah bentuk sediaan gel, berwarna coklat, dan tidak berbau.

4.7.3.2 Uji homogenitas

Tujuan:

Untuk mengetahui homogenitas dari sediaan gel, sehingga mengetahui distribusi partikel atau granul dalam sediaan gel.

Metode:

Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan 0,5 gram gel pada kaca transparan (Titaley, 2014).

Interpretasi Hasil:

Sediaan uji harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Titaley, 2014).

4.7.3.3 Uji pH

Tujuan:

Untuk mengetahui pH dari sediaan gel ekstrak lengkuas, apakah masuk kedalam rentang pH yang masih bisa diterima oleh kulit.

Metode:

Pengujian pH ini dilakukan dengan menggunakan alat *pH meter Crison Type LVT* yang dilengkapi dengan 3 larutan buffer, khusus

untuk sediaan semisolid. Dikalibrasi terlebih dahulu kemudian dicelupkan kedalam aquades untuk dibersihkan. Selanjutnya dicelupkan kedalam gel sampai *pH meter* membaca nilai pH yang stabil. Pengujian pH dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

Interpretasi Hasil:

pH dari sediaan gel yang diperoleh sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5-7 (Man,2009).

4.7.3.4 Uji daya sebar

Tujuan:

Untuk mengetahui konsistensi massa gel sehingga dapat diketahui kemudahan pengolesan sediaan gel dikulit

Metode:

Pemeriksaan daya sebar dapat dilakukan dengan sampel gel 1 gram gel diletakkan diatas kaca transparan yang ditutup kaca transparan lain dan diberi beban tertentu masing-masing 10 g, 20 g, 50 g dan 100 g. Kemudian dibiarkan selama 60 detik dan dihitung pertambahan luas daerah yang diberi beban. (Hasyim, 2012).

Interpretasi hasil:

Luas permukaan sediaan gel dengan penambahan beban semakin meluas maka semakin bagus pula daya sebar gel.

4.7.3.5 Uji daya Lekat

Tujuan:

Untuk mengetahui daya lekat dan seberapa lama sediaan gel mampu melekat pada kulit.

Metode:

Pemeriksaan daya lekat dilakukan dengan gel yang akan diuji diambil sebanyak 1 gram kemudian dioleskan pada sebuah plat kaca. Plat kaca yang kedua ditempelkan sampai kedua plat menyatu. Ditekan dengan beban seberat 1 kg selama 5 menit setelah itu beban dilepas. Dicatat waktu sampai kedua plat saling lepas. Dilakukan replikasi tiga kali (Hasyim, 2012).

Interpretasi Hasil:

Waktu pelekatan sediaan gel lebih lama maka akan semakin bagus daya lekat gel pada kulit.

4.7.4 Uji Daya Hambat Bakteri

4.7.4.1 Kontrol bakteri

Kontrol bakteri adalah medium yang diberi bakteri *S. epidermidis* tanpa diberi perlakuan 15 ml nutrisi agar yang telah disterilkan dicampur dengan 10^8 CFU/ml bakteri *S. epidermidis* dihomogenkan kemudian ditunggu hingga agar mengeras. Setelah mengeras, medium agar dilubangi menggunakan antena tanpa diberi apapun didalam lubang. Diameter sumuran adalah 6mm

sama dengan diameter cakram. Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

4.7.4.2 Kontrol gel

Kontrol gel pada penelitian ini adalah medium bakteri yang diberikan gel tanpa ekstrak lengkuas 15 ml nutrisi agar yang telah disterilkan dicampur dengan 10^8 CFU/ml bakteri *S. epidermidis* dihomogenkan kemudian ditunggu hingga agar mengeras. Setelah mengeras, agar dilubangi, lalu dipipet ke dalam lubang. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Kontrol gel berikutnya adalah medium bakteri yang diberikan aquades. Selanjutnya 15 ml nutrisi agar yang telah disterilkan dicampur dengan 10^8 CFU/ml bakteri *S. epidermidis* dihomogenkan kemudian ditunggu hingga agar mengeras. Setelah mengeras, agar dilubangi, lalu dipipet aquades ke dalam lubang dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

4.7.4.3 Perlakuan

Perlakuan adalah medium bakteri yang telah diberi perlakuan berbagai konsentrasi sediaan gel ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) dan berbagai konsentrasi ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*). Selanjutnya 15 ml nutrisi agar yang telah disterilkan dicampur dengan 10^8 CFU/ml bakteri *S. epidermidis* dihomogenkan kemudian ditunggu hingga agar mengeras. Setelah mengeras, agar dilubangi, lalu dipipet ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20% ke dalam lubang. Kemudian, nutrisi

agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, lalu diamati daya hambat minimumnya.

Perlakuan berikutnya adalah medium bakteri yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi sediaan gel ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*). 15 ml nutrisi agar yang telah disterilkan dicampur dengan 10⁸ CFU/ml bakteri *S. epidermidis* dihomogenkan kemudian ditunggu hingga agar mengeras. Setelah mengeras, agar dilubangi, lalu dipipet gel ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20% ke dalam lubang. Kemudian, nutrisi agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, lalu diamati daya hambat minimumnya.

4.8 Analisis Data

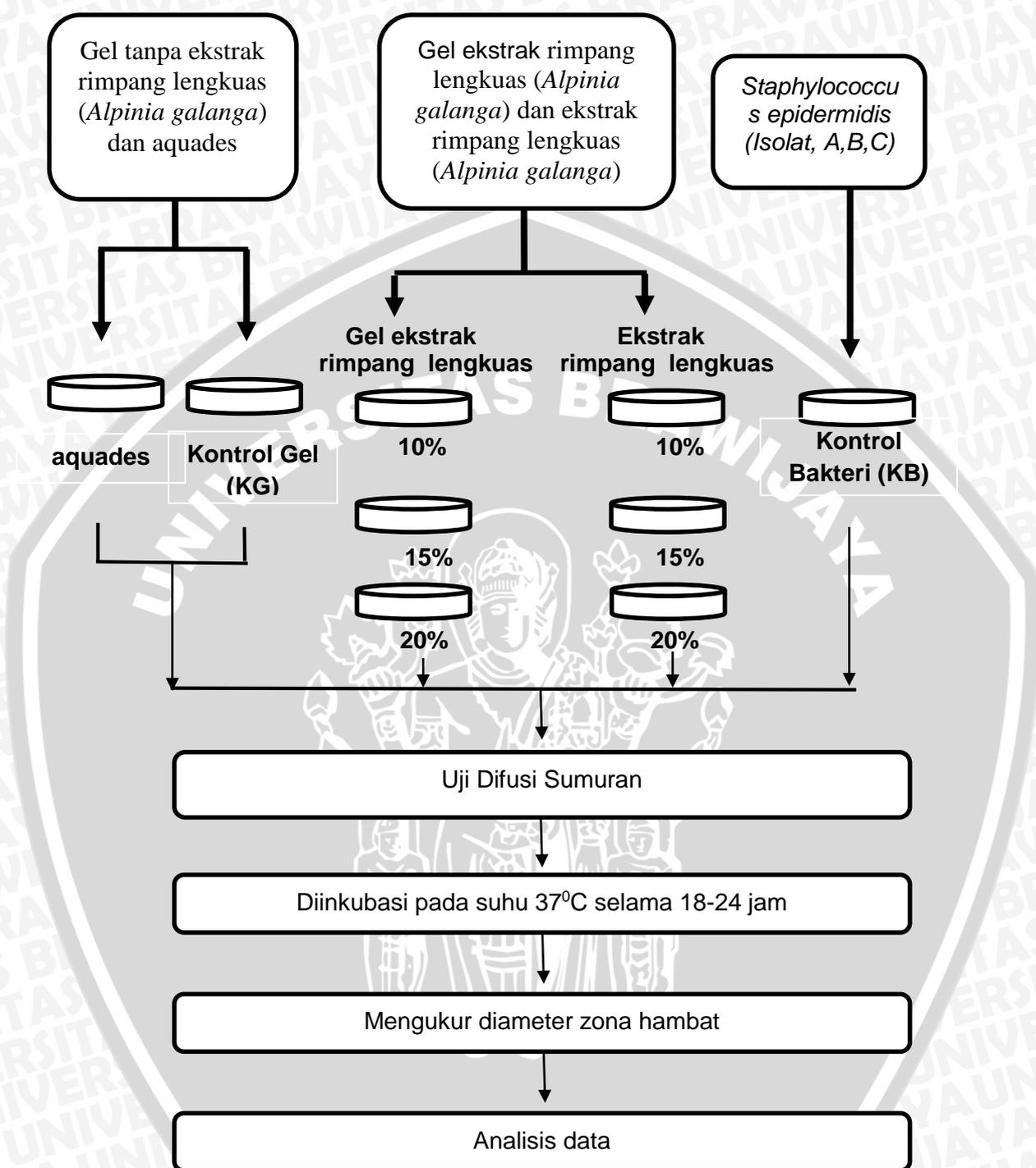
Analisis data pada penelitian ini menggunakan uji Korelasi *Pearson*, *independent t*, dan Regresi Linear. Uji statistik Korelasi *Pearson* yang bertujuan untuk mengetahui adanya hubungan antara penghambatan koloni bakteri *S. epidermidis* oleh sediaan gel dan ekstrak lengkuas dengan konsentrasi yang berbeda. Analisa selanjutnya yang digunakan yaitu Uji statistik *independent t* bertujuan untuk membandingkan aktivitas ekstrak rimpang lengkuas dengan sediaan gel ekstrak rimpang lengkuas pada konsentrasi yang sama dalam menghambat pertumbuhan *S. epidermidis*. Analisis lain yang juga dilakukan adalah Regresi Linier untuk mendapatkan persamaan garis dari masing-masing kurva konsentrasi gel dan ekstrak lengkuas terhadap diameter zona hambat bakteri *S. epidermidis*. Persamaan garis dari regresi linear bertujuan untuk

mendapatkan konsentrasi ekstrak lengkuas yang memiliki potensi yang sama dengan antibiotik amoksisiklav.

Korelasi *Pearson* digunakan untuk mengukur kuat hubungan antara variabel, bentuk atau arah hubungan dan besarnya kontribusi variabel bebas terhadap variabel terikat. Besar koefisien korelasi (R) berkisar di antara -1 sampai dengan +1. Jika koefisien korelasi bernilai nol (0), maka variabel yang diuji tidak memiliki hubungan. Nilai koefisien korelasi bernilai positif memiliki arti bahwa apabila nilai variabel bebas ditingkatkan, maka nilai variabel terikat akan meningkat. Berbeda dengan nilai negatif yang memiliki arti bahwa apabila nilai variabel bebas ditingkatkan, maka nilai variabel terikat akan menurun. Hubungan antar variabel diinterpretasikan sangat tinggi atau kuat bila koefisien korelasi bernilai 0.800 – 1.000. Regresi Korelasi *Pearson* digunakan untuk variabel yang berbentuk interval atau rasio. Data dari setiap variabel harus berdistribusi normal, bersifat linier dan data bersifat homogeny (Widiyanto, 2013).

Uji *independent t* digunakan untuk menguji perbedaan dua rata-rata populasi yang datanya berbentuk kuantitatif. Uji statistik *Independent t* menggunakan sampel yang berasal dari populasi yang berbeda. Syarat dalam melakukan uji *independent t* adalah data yang diperoleh berdistribusi normal dan varians homogeny (Widiyanto, 2013).

Pada regresi linier terdapat persamaan perubahan varian baik kenaikan maupun penurunan pada variabel bebas dan variabel terikat. Oleh karena itu, sebelum dilakukan analisis regresi, perlu diketahui bentuk hubungan dari data yang diperoleh peneliti. Prosedur untuk mengetahui apakah bentuk hubungan regresi linier atau tidak maa dilakukan uji linieritas regresi (Widiyanto, 2013).



Gambar 4.1 Skema Uji Aktivitas Antibakteri *S. epidermidis*