

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini merupakan studi eksperimental. Pada penelitian ini dilakukan pada variabel bebas dan diujikan pada variabel kontrol (Suryana, 2010). Dengan metode yang digunakan adalah metode uji difusi sumuran.

#### 4.2 Sampel dan Pengulangan

Penghitungan sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus  $P(n - 1) \geq 15$  dan hasil akhirnya harus bulat (Basuki, 2008). P adalah jumlah perlakuan dalam penelitian ini yaitu sebanyak 4 perlakuan yang terdiri larutan ekstrak dan gel konsentrasi 0%, 10%, 15%, dan 20%. Kontrol positif menggunakan akuades dan sediaan tanpa ekstrak. Sehingga banyaknya pengulangan yang dilakukan adalah adalah :

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

p = Banyak perlakuan

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

n = Banyak sampel

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \sim 5$$

Sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah 5, yaitu 5 isolat bakteri yang berbeda.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak lengkuas dan konsentrasi ekstrak lengkuas dalam sediaan gel.

#### 4.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah daya hambat ekstrak lengkuas dan sediaan gel ekstrak lengkuas terhadap bakteri *S. aureus*.

### 4.4 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di dua tempat di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Yaitu di Laboratorium Farmasi FKUB dan Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Lama penelitian mulai bulan Februari sampai Juni 2015.

### 4.5 Alat dan Bahan

#### 4.5.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah toples kaca 1,5 L, kain flannel, batang pengaduk, gelas ukur, gelas *beaker*, *rotary evaporator*, *overhead stirrer*, Erlenmeyer, neraca digital, pipet tetes, pH meter, mortar, stemper, aluminium foil, penangas air, cawan porselen, oven, cawan petri, mikropipet, corong kaca, objek gelas, cakram kertas, ose, autoklaf, lidi kapas, pinset dan pot gel.

#### 4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah serbuk simplisia rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*), etanol 70%, bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB, bahan formulasi gel yaitu Carbomer dan TEA yang diperoleh dari Panadia Laboratory Malang, propilenglikol dari CV. Makmur

Sejati Malang, dan akuades bebas CO<sub>2</sub>. Serta media pertumbuhan bakteri menggunakan Mueller-Hinton Agar (MHA).

#### 4.6 Definisi Operasional

- Serbuk simplisia rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) di beli dari Batu Materi Medika
- Ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) adalah ekstrak hasil ekstraksi serbuk simplisia rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:5
- Gel Ekstrak Lengkuas adalah ekstrak lengkuas yang diformulasikan menjadi bentuk sediaan gel dengan penambahan carbomer, TEA, Propilenglikol, dan akuades bebas CO<sub>2</sub>
- Daya hambat bakteri ditunjukkan dengan diameter zona bening yang tampak disekitar lubang sumuran pada media MHA setelah diberikan perlakuan
- Akuades bebas CO<sub>2</sub> adalah akuades yang dibuat dengan cara dididihkan menggunakan *beaker glass* diatas penangas air dan ditutup

#### 4.7 Prosedur kerja

##### 4.7.1 Prosedur Ekstraksi

- 1) Menimbang 200 g serbuk simplisia *Alpinia galanga* dalam cawan porselen menggunakan neraca digital
- 2) Menyiapkan 1 L etanol 70%. diukur dengan menggunakan gelas ukur
- 3) Membersihkan toples kaca sebelum digunakan. Basahi dengan sedikit etanol 70%

- 4) Menuangkan serbuk simplisia kedalam toples kaca, kemudian cawan dibersihkan dengan etanol 70%
- 5) Menuang semua sisa etanol 70% kedalam toples
- 6) Melakukan pengadukan dengan *overhead stirrer* sekali selama 5 menit
- 7) Tutup mulut toples dengan alumunium foil, dan tutup rapat
- 8) Diamkan selama kurang lebih 24 jam
- 9) Saring hasil maserat dengan kain flannel
- 10) Dilakukan remaserasi sebanyak 3 kali dengan metode yang sama
- 11) Bagian yang larut dengan etanol 70% di uapkan dengan *rotary evaporator* suhu 40° C dan 70 putaran per menit
- 12) Dikeringkan dengan oven bersuhu 40° C
- 13) Diperoleh ekstrak kental lengkuas

#### 4.7.2 Pembuatan Sediaan Gel

Proses pembuatan gel adalah:

- 1) Carbomer ditimbang dengan neraca digital sebanyak 0,4 g dan didispersikan dalam akuades bebas CO<sub>2</sub> selama 30 menit dalam mortir kemudian lalu diaduk.
- 2) TEA ditimbang dengan neraca digital sebanyak 0,2 g.
- 3) Ditambahkan TEA pada mortir lalu diaduk dalam mortir sampai terbentuk masa gel.
- 4) Propilenglikol ditimbang dengan neraca digital sebanyak 3 g.
- 5) Ditambahkan propilenglikol pada mortir lalu diaduk ad homogen.
- 6) Ekstrak lengkuas ditimbang dengan neraca digital sebanyak 2 g (konsentrasi 10%), 3 g (konsentrasi 15%), 4 g (konsentrasi 20%).

- 7) Ekstrak yang sudah ditimbang dilarutkan dengan sedikit akuades bebas CO<sub>2</sub> pada gelas arloji.
- 8) (7) dimasukkan kedalam mortir dan diaduk sampai homogen.
- 9) Dimasukan sisa akuades bebas CO<sub>2</sub>.
- 10) Diaduk sampai homogen.
- 11) Dimasukan dalam pot gel.

**Tabel 4.1 Rancangan Formula sediaan Gel**

Nama Bahan	Kadar Bahan	Berat Bahan	Fungsi
<b>Ekstrak rimpang Lengkuas (<i>Alpinia galanga</i>)</b>	10%	2 g	Bahan Aktif
	15%	3 g	
	20%	4 g	
<b>Carbomer</b>	2%	0,4 g	Pembentuk gel
<b>Propilenglikol</b>	15%	3 g	Peningkat penetrasi, humektan
<b>TEA</b>	1%	0,2 g	Peningkat pH
<b>Akuades bebas CO<sub>2</sub></b>	ad 100%	ad 20 g	Pelarut

Carbomer dalam formula digunakan sebagai bahan pembentuk gel. Konsentrasi carbomer sebagai pembentuk gel adalah sebesar 0,5 – 2% (Rowe, 2009). Pada formula dipilih konsentrasi terbesar agar gel yang dihasilkan bisa lebih kental dan tidak terlalu cair. TEA dalam formula sebagai pembentuk masa gel karena sifatnya sebagai agen pembasa sehingga meningkatkan pH carbomer dan terbentuk gel yang bagus (Rowe, 2009). Propilenglikol dalam formula utamanya digunakan sebagai peningkat penetrasi sehingga bisa menghantarkan zat aktif ekstrak lengkuas meresap menembus kulit, selain itu propilenglikol juga memiliki efek humektan atau melembabkan sehingga mampu menjaga hidrasi kulit (Rowe, 2009).

Spesifikasi sediaan gel yang dibuat berwarna kuning, beraroma aromatis, mempunyai daya sebar pada rentang 5-7 cm, dengan pH 4-6, sediaan homogen.

#### **4.7.3 Evaluasi Sediaan**

##### **4.7.3.1 Uji Organoleptik**

Tujuannya adalah untuk melihat penampakan fisik dari bentuk sediaan yang meliputi warna, konsistensi dan bau menggunakan metode pengamatan secara visual dan penciuman. Interpretasi hasilnya sediaan berwarna coklat, sedikit cair, dan beraroma khas lengkuas.

##### **4.7.3.2 Uji Daya Sebar**

Tujuannya adalah untuk mengetahui daya sebar dari sediaan gel sehingga mengetahui daya sebar gel pada kulit. Pengujian dilakukan dengan mengoleskan 1 gram sampel diantara gelas preparat kemudian ditekan dengan diberi beban 10 g, 20 g, 50 g, dan 100 g lalu diukur diameter penyebarannya setelah 1 menit (Hasyim, 2012). Interpretasinya semakin luas diameter penyebarannya semakin bagus daya sebar gel tersebut.

##### **4.7.3.3 Uji pH**

Tujuannya adalah untuk mengetahui pH dari sediaan gel apakah sesuai dengan pH kulit manusia. Metodenya adalah melakukan kalibrasi terhadap alat dengan mencelupkan elektroda kedalam larutan dapar pH netral (7,01) dan larutan dapar pH asam (4,01) lalu elektroda dicelupkan dalam sampel dan tunggu sampai nilainya konstan (Panjaitan, 2012). Intepretasinya pH sediaan memenuhi persyaratan pH kulit yaitu 4,5-7 (Lukman, 2012).

##### **4.7.3.4 Uji Homogenitas Fisik**

Tujuannya adalah untuk melihat homogenitas dari suatu sediaan gel apakah terdapat gumpalan partikel atau tidak. Metodenya adalah dengan

mengambil sedikit sampel dan diletakkan diantara kaca preparat dan ditekan kemudian diamati homogenitasnya. Intepretasi hasilnya dikatakan homogen apabila tidak didapati adanya butiran kasar (Panjaitan, 2012).

#### 4.7.3.5 Uji Daya Lekat

Tujuannya adalah untuk mengetahui kemampuan melekat suatu sediaan gel agar diketahui kemampuan melekatnya pada kulit. Metodanya dengan mengambil 1g gel kemudian diletakan diatas plat kaca lalu ditekan dengan plat kaca lain dan diberi beban 1kg selama 5 menit lalu plat dilepas dan dihitung waktunya sampai kedua plat terlepas. Semakin lama waktu pelekatan gel semakin bagus daya lekat dikulitnya (Hasyim, 2012).

#### 4.7.4 Uji Daya Hambat Bakteri

##### 4.7.4.1 Prosedur Identifikasi Bakteri

###### 4.7.4.1.1 Pewarnaan Gram

- 1) Koloni bakteri diambil secara aseptis menggunakan ose.
- 2) Diletakkan pada objek gelas yang telah diberi alkohol 70%.
- 3) Rendam gentian violet selama 2-3 menit, lalu cuci dengan air mengalir.
- 4) Rendam dengan lugol selama 1 menit, lalu cuci dengan air mengalir.
- 5) Rendam dengan alkohol absolut selama 45 detik, lalu cuci dengan air mengalir.
- 6) Rendam dengan safranin 45 detik, lalu cuci dengan air mengalir.
- 7) Keringkan.
- 8) Lihat dibawa mikroskop dengan perbesaran 1000x. *S. aureus* berbentuk bulat dan berwarna ungu (gram positif).

#### 4.7.4.1.2 Uji Koagulase

- 1) Mengambil biakan bakteri dengan menggunakan ose dan dioleh diatas gelas objek.
- 2) Disuspensikan dengan akuades secara perlahan.
- 3) Ditetesi plasma dan digoyang-goyangkan.
- 4) Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya gumpalan.

#### 4.7.4.1.3 Uji Katalase

- 1) Diambil sedikit hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 3% dengan menggunakan pipet dan ditetaskan diatas gelas obyek.
- 2) Biakan *S. aureus* dioleskan pada gelas obyek.
- 3) Dibentuk suspensi dan diaduk secara perlahan.
- 4) Reaksi positif ditunjukkan dengan timbulnya gelembung.

#### 4.7.4.1.4 Uji MSA

- 1) Mengambil biakan dengan menggunakan Ose.
- 2) Biakan dioleskan diatas MSA.
- 3) Diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$  selama 24 jam.
- 4) Diamati hasilnya. Reaksi positif ditandai dengan biakan bakteri akan berwarna putih kekuningan dan muncul zona kuning disekitar bakteri.

#### 4.7.4.2 Pembuatan Media Uji bakteri

- 1) MHA dilarutkan dalam akuades di dalam Erlenmeyer.
- 2) Di homogenkan dengan menggunakan *stirer* diatas penangas air sampai mendidih.
- 3) Larutan MHA dituang diatas cawan petri yang steril.
- 4) Cawan petri disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}C$  selama kurang lebih 5 menit.

- 5) Mengambil biakan bakteri hasil inokulasi pada media McConkey dengan menggunakan ose.
- 6) Memastikan konsentrasi bakteri sampai  $10^8$  CFU/ml dengan menggunakan pengenceran akuades steril dan pengukuran absorbansi.
- 7) Menanam bakteri pada media MHA didalam cawan petri, dan meratakan dengan menggunakan lidi kapas.
- 8) Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18 - 24 jam.
- 9) Media didinginkan pada suhu ruangan.
- 10) Lalu media dilubangi dengan pembuat lubang steril berukuran 5 mm.

#### 4.7.4.3 Prosedur Pengujian Anti mikroba

- 1) Disiapkan media uji dan diberi 8 lubang sumuran.
- 2) Menyalakan bunsen.
- 3) Menuang ekstrak cair lengkuas dengan menggunakan mikropipet sebanyak  $40\ \mu\text{L}$  pada lubang sumuran.
- 4) Memasukan gel ekstrak lengkuas dengan menggunakan *syringe* insulin steril sampai memenuhi lubang.
- 5) Diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18 sampai 24 jam.
- 6) Aktivitas anti bakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening yang tampak pada media MHA.

#### 4.7.4.4 Kontrol Bakteri

Kontrol bakteri dalam penelitian ini adalah bakteri *S. aureus* yang dibiakan dalam media bakteri tanpa mendapat perlakuan.

#### 4.7.4.5 Kontrol Pembawa

Kontrol pembawa dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan akuades dan basis gel tanpa zat aktif yang diletakan di dalam lubang sumuran media bakteri lalu diinkubasi selama 18 sampai 24 jam pada suhu 37 °C.

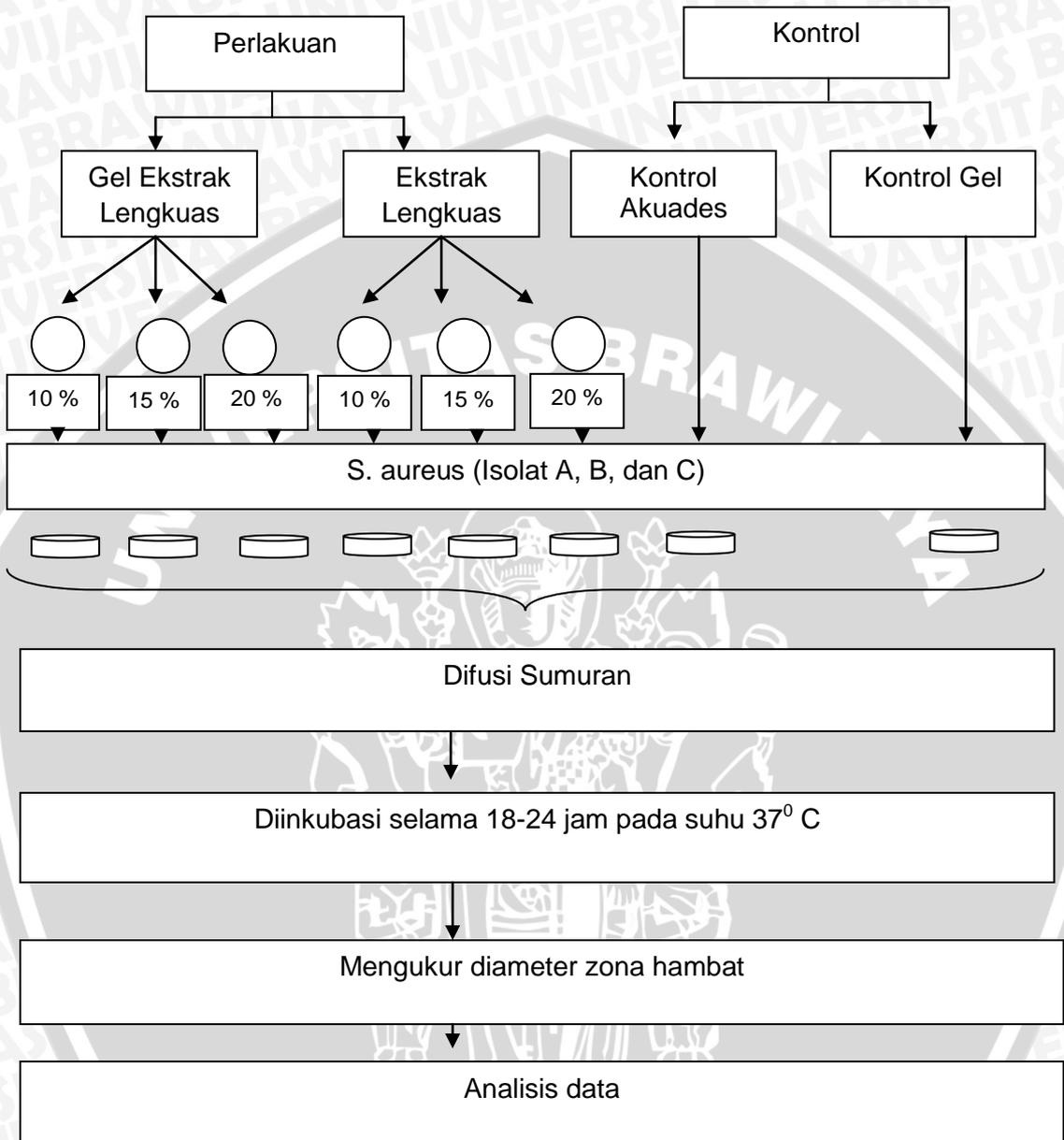
#### 4.7.4.6 Perlakuan

Perlakuannya adalah dengan memasukan sediaan gel ekstrak lengkuas dengan konsentrasi 0%, 3%, 5%, dan 7% serta ekstrak lengkuas konsentrasi 0%, 3%, 5%, dan 7% didalam lubang sumuran pada media MHA masing-masing 40 µl dan diinkubasi selama 18 sampai 24 jam pada suhu 37 °C.

#### 4.8 Analisis Data

Metode analisis data yang digunakan adalah menggunakan *independent t-test*, yaitu metode analisis untuk membandingkan rata-rata dari kedua variabel berbeda yang masing-masing tidak saling tergantung (Urda, 2005), dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata diameter hambat ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan gel ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap *S. aureus*. Sebelum dilakukan uji t-test, data haruslah memenuhi persyaratan terdistribusi normal dan homogen (Sastroasmoro, 2011).

Analisis data yang juga digunakan adalah menggunakan regresi linear untuk mengetahui hubungan antara kedua variabel yaitu variabel bebas dan variabel tergantung dan juga korelasi Pearson untuk mengetahui adanya keeratan hubungan antar kedua variabel tersebut (Tumbelaka dkk., 2011). Variabel bebas di sini adalah nilai diameter hambat bakteri sedangkan variabel tergantungnya berupa konsentrasi gel.



Gambar 4.1 Uji Aktivitas Antibakteri *S. aureus*