

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi korbopol terhadap efektivitas antibakteri dari gel ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica (L.) Less.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Adapun tahapan pelaksanaan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu pengumpulan bahan, pembuatan simplisia, ekstraksi, pembuatan sediaan gel ekstrak daun beluntas, uji efektivitas sediaan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Tahap terakhir yaitu analisis data untuk memperoleh kesimpulan dari penelitian.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah gel ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica (L.) Less.*) konsentrasi karbopol 1% dan 1,5% .

3.2.2 Sampel

Sampel adalah sebagian gel ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica (L.) Less.*) konsentrasi karbopol 1% dan 1,5% terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium mikroorganisme Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang pada bulan April - Juni 2021.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Klasifikasi variabel pada penelitian ini ada dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi karbopol dalam gel ekstrak daun beluntas. Sedangkan variabel terikatnya adalah diameter zona hambat yang terbentuk dengan ditandai zona bening pada media agar. Definisi operasional variabel dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 3.4 Definisi Operasional

Variabel	Sub Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
Efektivitas gel dengan variasi konsentrasi karbopol terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Sensitifitas	Mengetahui adanya efektivitas dari gel dengan variasi konsentrasi karbopol terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Dilihat dengan adanya zona bening pada media agar yang telah diberikan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Jangka Sorong	mm

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlemeyer, cawan petri, magnetic stirrer, kaki 3, kawat kassa, inkubator, pipet mikro, kulkas, vortex, jarum ose, autoklaf, bunsen, gelas ukur, jangka sorong.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah NA agar, biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, NaCl 0.9%, aquadest, etanol 70%, kapas, karet gelang, kertas coklat, dan sediaan gel penguji ekstrak daun beluntas.

3.5.3 Pengambilan Tanaman

Pengambilan tanaman dilakukan di daerah Turen Kabupaten Malang. Daun beluntas dipetik secara manual menggunakan tangan, daun yang dipetik adalah daun yang tua dan tidak termakan ulat.

1. Ekstraksi Daun Beluntas

Ekstraksi daun beluntas dibutuhkan untuk mempermudah mengambil metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai antibakteri pada daun beluntas menggunakan etanol 96% dengan metode maserasi yang akan digunakan sebagai bahan aktif pada sediaan gel ekstrak daun beluntas.

2. Rancangan Formula

Tabel 3.5 Rancangan formula

<i>No</i>	<i>Bahan</i>	<i>Formula</i> <i>/Konsentrasi</i> <i>(%)</i>		<i>KETERANGAN</i>
		<i>I</i>	<i>II</i>	
1.	Sampel Ekstrak	5	5	Zat aktif
2.	Karbopol	1	1,5	Basis gel
3.	Gliserin	30	30	Pemberian basa
4.	TEA	1	1	Humektan
5.	Metil Paraben	0,2	0,2	Pengawet
6.	Aquadest	Ad 100	Ad 100	Pelarut

3. Pembuatan Sediaan Gel

1. Dilarutkan metilparaben sebanyak 0,2 gram dengan 30 mL aquadest panas suhu 90°C ke dalam beaker glass aduk ad homogen.
2. Dimasukkan karbopol (Formula I =1 gram, Formula II=1,5 gram) kedalam mortir kemudian dicampur dengan metil paraben yang dilarutkan sebelumnya aduk ad homogen.
3. Ditambahkan 1 gram TEA, aduk ad homogen.
4. Ditambahkan 5 gram ekstrak yang sudah dicampur dengan 30 mL gliserin, aduk ad homogen.
5. Ditambahkan sisa aquades, aduk ad homogen.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Uji Efektivitas Gel Ekstrak Daun Beluntas variasi konsentrasi karbopol Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

3.6.1.1 Sterilisasi Alat

Dilakukan sterilisasi dengan metode panas kering dan panas lembab sedangkan sterilisasi medium dilakukan dengan panas lembab. Sisa pengujian sebelum dibuang dilakukan proses inaktif terhadap mikroorganismenya menggunakan metode panas lembab yang selanjutnya dibuang pada tempat pengolahan limbah. Alat-alat yang digunakan dalam pengujian antibakteri harus disterilkan terlebih dahulu sebelum dipakai. Alat dan media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sedangkan jarum ose disterilkan menggunakan pemijaran dengan nyala api bunsen.

A. Sterilisasi cawan petri

1. Siapkan cawan petri sebanyak 3.
2. Bungkus dengan kertas coklat.

3. Cawan petri diikat menjadi satu dengan karet gelang.
4. Cawan petri dimasukkan ke dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.

B. Sterilisasi alat dan bahan

1. Disiapkan alat dan bahan.
2. Dibungkus dengan kertas coklat kecuali pinset dan bor yang dibungkus dengan kertas coklat.
3. Dimasukkan semua alat dan bahan ke dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.6.1.2 Pembuatan suspensi bakteri

Dibuat larutan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diambil 1 ose bakteri, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9%, dengan biakan murni *Staphylococcus aureus* didalam tabung reaksi dikocok sampai homogen menggunakan vortex. Lalu masukkan kedalam cuvet sampai tanda batas yang ada pada cuvet untuk mengukur kekeruhan suspensi mikroba uji dengan alat spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 580 nm dengan transmitan 25 % (setara dengan kepadatan 10^8).

3.6.1.3 Pembuatan Media Bakteri

a. Media Agar Miring

1. Ditimbang Nutrient Agar (NA) sebanyak 4 gram.
2. Dilarutkan dalam 200 ml aquades (20 g/1000 ml) menggunakan erlenmeyer.
3. Dihomogenkan dengan batang pengaduk diatas bunsen sampai mendidih.
4. Dituangkan 7 ml pada masing-masing pada 3 tabung reaksi steril
5. Ditutup mulut tabung dengan kapas dan dibungkus dengan kertas coklat dan diikat dengan karet gelang.

6. Disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
7. Di diamkan pada suhu ruangan selama 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30°.
8. Media Agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri.

b. Pembuatan Media Pengujian

1. Dipipet 1 pipet mikro larutan suspensi bakteri yang sudah dibuat.
2. Dituangkan ke dalam cawan steril.
3. Dituang sisa media yang sudah dibuat dan disterilkan sebelumnya ke dalam cawan sebanyak 15 ml dalam keadaan hangat.
4. Didiamkan hingga memadat.
5. Dibuat 8 lubang sumuran menggunakan bor pada 1 cawan.

c. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji dari gel ekstrak daun dilakukan dengan cara sebagai berikut (Kindangen *et al.*, 2018).

- a. Gel dengan konsentrasi basis 1% ditimbang sebanyak 2 g kemudian dilarutkan dalam 2 ml aquades.
- b. Gel dengan konsentrasi basis 1,5% ditimbang sebanyak 2 g kemudian dilarutkan dalam 2 ml aquades.

d. Uji Efektivitas Antibakteri menggunakan Metode Sumuran

1. Disiapkan 3 cawan petri yang sudah terdapat lubang sumuran.
2. Diteteskan larutan uji sebanyak 20 µl menggunakan mikropipet (tidak boleh sampe meluber keluar lubang).
3. Diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
4. Diukur zona hambat/zona bening yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini, pengaruh variasi konsentrasi karbopol terhadap uji efektivitas antibakteri gel ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica (L.) Less.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* disajikan dalam bentuk tabel. Analisa data yang dilakukan menggunakan aplikasi SPSS dan diuji menggunakan Uji *Paired Sampel t-Test* jika data berdistribusi normal dan apabila data tidak berdistribusi normal maka dilakukan Uji *Mann Whitney*.