

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dalam bidang teknologi farmasi yang bertujuan untuk mengetahui formulasi sediaan *patch* dari asam usnat dan menentukan uji efektivitas bakteri *Staphylococcus aureus*. Rancangan penelitian yang dilakukan adalah memformulasi asam usnat menjadi sediaan *patch* dan menentukan uji aktifitas antibakteri pada *Staphylococcus aureus*. Sediaan dibuat dalam 3 variasi konsentrasi asam usnat. Konsentrasi yang digunakan yaitu :

- Formula 1 asam usnat : 5%
- Formula 2 asam usnat : 10%
- Formula 3 asam usnat : 15%

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Baiturrahmah dan laboratorium Mikrobiologi FK Unand dan pada tanggal 28 November 2024 sampai Februari 2025.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel dalam penelitian ini adalah asam usnat yang dibeli di PT. Andalas Sitawa Fitolab.

3.4 Teknik Pengumpulan Data

3.4.1 Alat

Timbangan analitik (protis), neraca analitik (fujitsu), oven (memmert), autoklaf, inkubator, alat gelas (pyrex dan iwaki), loyang, mortir dan stamfer, spatula, aluminium foil, pletster hypafix, pH meter (orion star A211), mikrometer, piknometer sekrup, tensile strength, elongation tester stograph, cawan penguap, lemari biosafety cabinet, hot plate, pipet tetes, kapas steril, kertas label, kapas, koran, cotton bud steril, pinset, jarum ose, kaca objek, lampu spiritus, Spektrofotometer UV-Vis, jangka sorong, handscoon, masker, pisau steril dan tisu.

3.4.2 Bahan

Asam usnat, HPMC, metil paraben, PVP, propilen glikol, DMSO, aquadest, kloroform, biakan murni *Staphylococcus aureus*, media *nutrient agar* dan NaCl.

3.4.3 Jenis Data

Penelitian ini menggunakan metode kuantitatif yang merupakan metode yang menitikberatkan pada analisis perhitungan dari pengujian. Jenis data yang digunakan adalah data primer yang dilakukan sendiri oleh peneliti.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pemeriksaan Bahan Tambahan

Pemeriksaan bahan tambahan sesuai dengan standar HOPE (*Handbook Of Pharmaceutical Excipients*) edisi 6 tahun 2009 FI (Farmakope Indonesia) edisi 6 tahun 2020.

3.5.2 Pembuatan Sediaan *Patch* Asam Usnat

Tabel 3.1 Rancangan Formulasi Sediaan *Patch* Asam Usnat

Nama Bahan	Khasiat	F0 (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Asam usnat	Zat aktif	0	5%	10%	15%
HPMC	Polimer	3%	3%	3%	3%
PVP	Polimer	1%	1%	1%	1%
Metil paraben	Pengawet	1%	1%	1%	1%
Propilenglikol	<i>Plasticizer</i> Pengawet	5%	5%	5%	5%
DMSO	<i>Enhancer</i>	1%	1%	1%	1%
Kloroform ad	Pelarut	100%	100%	100%	100%

- Pembuatan Sediaan *Patch* Asam Usnat :

Siapkan alat dan bahan yang sudah ditimbang, HPMC dilarutkan dalam air panas, PVP dilarutkan dalam sedikit air panas kemudian dicampurkan dengan larutan HPMC dan di aduk sampai homogen (larutan 1). Metil paraben di larutkan dengan propilen glikol (larutan 2). Asam usnat dilarutkan dengan kloroform kemudian ditambahkan kedalam (larutan 1), di aduk sampai homogen lalu tambahkan larutan 2 aduk sampai homogen, tambahkan DMSO aduk sampai homogen. Tambahkan sisa kloroform aduk hingga homogen. Kemudian tuangkan

kedalam cetakan atau loyang berukuran 10 x 15 cm yang telah dilapisi aluminium foil dan keringkan dengan oven pada suhu 20°C selama 8 jam. Setelah kering, patch dilepaskan dari cetakan lalu di potong sesuai ukuran yang diperlukan (2 cm x 3 cm) untuk dilakukan evaluasi, (5 cm x 5 cm) untuk di lakukan untuk uji tarik.

3.5.3 Evaluasi Sediaan *Patch*

a) Pengamatan organoleptik

Pengujian dilakukan dengan melihat tekstur, warna dan bau sediaan selama 24 jam.

b) Uji pH

Pengujian dilakukan dengan menambahkan 10 ml aquadest bebas CO₂ ke dalam *patch*, pH permukaan diuji dengan pH meter. Kriteria rentang pH yang aman untuk mencegah iritasi kulit adalah 4,5 – 6,5. (Yunnisa, A. S. 2021).

c) Keseragaman bobot *patch*

Pengujian dilakukan dengan menimbang *patch* di timbangan analitik, berat rata-rata dan standar deviasi kemudian dihitung untuk masing-masing *patch*. Untuk memenuhi syarat keragaman bobot, *patch* harus konsisten dan tidak melebihi 5% (Yunnisa, A. S. 2021).

d) Ketebalan patch

Pengujian dilakukan dengan mengukur ketebalan masing-masing *patch* menggunakan mikrometer pada tiga titik yang berbeda. Terlalu

tipis *patch* akan membuatnya rapuh sedangkan jika terlalu tebal akan menyulitkan obat masuk ke dalam tubuh. Ketebalan *patch* tidak boleh lebih dari 1 μm (Yunnisa, A. S. 2021).

e) Daya serap kelembapan (*moisture up take*)

Pengujian dilakukan setelah *patch* disimpan selama 24 jam pada suhu ruang di dalam oven pada suhu 40°C dan ditimbang kembali. Daya serap kelembapan *patch* harus kurang dari 10% (Yunnisa, A. S. 2021).

Persen daya serap kelembapan dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Kelembapan} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

f) Kekuatan tarik *patch*

Uji kekuatan tarik dilakukan menggunakan alat uji tarik *tensile strength*. *Patch* yang telah dicetak dipotong dengan ukuran yang sesuai (10 cm panjang dan 15 cm lebar). Kemudian, *patch* dijepitkan dengan kecepatan konstan pada alat uji tarik. Hasil pengukuran akan ditulis sebagai hasil pengujian (Wahyuni *et al.*, 2023) Kekuatan uji tarik dan persentase perpanjangan dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Daya tarik (MPa)} = \frac{\text{gaya (kg)}}{\text{luas (cm}^2\text{)}}$$

Uji pemanjangan *patch* dilakukan menggunakan alat *elongation tester stograph*. Untuk menghitung persentase pemanjangan menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ Pemanjangan} = \frac{\text{panjang akhir} - \text{panjang awal}}{\text{panjang awal}} \times 100\%$$

g) Penetapan kadar

- Analisis asam usnat – standar asam usnat

Timbang 10 mg standar asam usnat, larutkan dengan kloroform hingga 100 ml, kemudian larutan di sonic selama ± 15 menit, buat beberapa konsentrasi, baca di Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal $\lambda = 284$ nm.

- Analisis asam usnat – sampel

Timbang sampel sebanyak 0,1 g larutkan dengan kloroform hingga 10 ml, kemudian larutan di sonic selama ± 15 menit, baca di Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal $\lambda = 284$ nm, perhitungan kadar dilakukan dengan perbandingan absorbansi sampel berbanding kurva standar asam usnat.

3.5.4 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Agar

1. Pengambilan Bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK Unand yang telah dibiakkan di media *nutrient agar*.

2. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum dibersihkan, alat yang digunakan harus dibersihkan dan keringkan. Alat seperti cawan petri dan corong yang dibungkus koran, tabung reaksi dan pipet tetes ditutup mulutnya dengan kapas lalu dibungkus satu persatu dengan kertas koran. Semua alat disterilkan dalam oven pada suhu 160°C selama 1 jam. Mulut erlenmeyer dan gelas ukur ditutup dengan kapas dan dibungkus satu persatu dengan kertas

koran lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit tekanan 15 lubis. Pinset, jarum ose dan kaca objek disterilkan dengan cara dibakar menggunakan lampu spiritus.

3. Pembuatan Media

a. Pembuatan media *nutrient agar*

Media *nutrient agar* ditimbang sebanyak 2,8 g lalu campurkan dengan 100 ml aquadest. Kemudian panaskan di atas hotplate hingga rata, kemudian sterilkan selama 1 jam pada autoklaf pada suhu 121°C untuk mencegah penyebaran mikroorganisme. Untuk penggunaan, media dapat dituang secara aseptis pada cawan petri steril setelah dibersihkan. Sebelum menuang media, tunggu hingga suam-suam kuku ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) dan biarkan pada suhu ruang hingga media memadat dengan sempurna.

b. Peremajaan bakteri

Bakteri uji diambil menggunakan jarum ose dari stok kultur murni kemudian bakteri disebarkan secara padat pada media *nutrient agar* sehingga membengkok secara zigzag dari atas ke bawah, biakkan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C.

c. Pembuatan suspensi bakteri uji

Koloni bakteri disuspensikan dalam larutan NaCl 0,9% dihomogenkan kemudian diukur kekeruhan dari suspensi yang setara dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5.

4. Pengujian Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Kirby-Bauer

a. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap asam usnat

Setelah suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam media *nutrient agar* secara zigzag, diamkan selama 30 menit. Pipet 10 μ l larutan asam usnat yang sudah diencerkan dengan kloroform dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15% pada kertas cakram kosong dan kontrol negatif kloroform. Kemudian kertas cakram diletakkan diatas permukaan media *nutrient agar* tadi. Lalu masukkan cawan petri ke dalam inkubator dengan suhu sebesar 37°C dan di inkubasi selama 24 jam. Pengujian diatas dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (triplo). Lalu hasil zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong kemudian dicatat.

b. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap sediaan *patch* dari asam usnat

Setelah suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam media *nutrient agar* secara zigzag, diamkan selama 30 menit. Letakkan sediaan *patch* dari asam usnat formula F0, F1, F2 dan F3 kemudian letakkan diatas permukaan media *nutrient agar* tadi. Setelah itu, masukkan cawan petri ke dalam inkubator dengan suhu 37°C dan di inkubasi selama 24 jam. Pengujian tersebut dilakukan sebanyak tiga

kali pengulangan (triplo). Dan hasil zona hambat yang terbentuk diukur dan dicatat.

3.6 Teknik Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini adalah *One Way ANOVA* dengan kemaknaan $p > 0,05$ untuk menunjukkan efek antibakteri pada semua kelompok perlakuan. Hasil akan berarti apabila perbandingan daya hambat pada setiap konsentrasi dan formula memberikan perbedaan yang nyata dan bermakna secara statistik.

3.7 Definisi Operasional

Dari landasan teori diatas, maka definisi operasional pada penelitian ini sebagai berikut :

Tabel 3.2 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Cara Mengukur	Hasil	Skala Ukur
1.	Asam Usnat	Konsentrasi asam usnat adalah hasil dari penghancuran kayu angin dengan metode maserasi kemudian pembuatan sediaan <i>patch</i> dengan berbagai konsentrasi.	Ditimbang asam usnat sesuai dengan konsentrasi. Alat ukur : Timbangan analitik	Konsentrasi asam usnat 5%, 10% dan 15% pada sediaan <i>patch</i>	Ordinal
2.	Diameter Zona Hambat	Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> adalah diameter dimana bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> tidak tumbuh disekitar cakram yang ditandai dengan adanya daerah bening yang diukur dengan satuan milimeter.	Mengukur diameter terluar zona bening disekitar cakram. Alat ukur : Jangka sorong	Diameter terpanjang (mm) zona bening	Rasio