

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menganalisis aktivitas penghambatan biofilm terhadap isolat klinis menggunakan teknik *microtiter plate biofilm assay* dengan penghambatan fase pertengahan dan fase pematangan dilanjutkan dengan menganalisis luaran klinis dari aktivitas antibiofilm ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* L. Merr) dalam sediaan nano gel berupa durasi penyembuhan dan morfologi luka pada hewan uji.

2.2 Subjek dan Objek Penelitian

2.2.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini menggunakan ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* L. Merr) dan sediaan nano gel dari ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* L. Merr).

2.2.2 Objek Penelitian

Objek penelitian ini menggunakan bakteri isolat klinis ulkus diabetikum dan hewan uji mencit (*Mus musculus* L.).

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

2.3.1 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dari bulan September - Desember 2023.

2.3.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur. Laboratorium Ekologi dan Konservasi Biodiversitas Hutan Tropis Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda. Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta.

2.4 Variabel Penelitian

2.4.1 Variabel Bebas

Sampel ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* L. Merr) yang efektif terhadap penyembuhan luka sayat yang terinfeksi isolat klinis dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15%.

2.4.2 Variabel Terikat

Adanya daya hambat dari formula 1 dengan konsentrasi 5%, formula 2 dengan konsentrasi 10% dan formula 3 dengan konsentrasi 15% pada sediaan nano gel ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* L. Merr) terhadap antibiofilm.

2.4.3 Variabel Terkontrol

Tipe hewan uji, bakteri uji, antibiotik klindamisin dengan konsentrasi 1% dan durasi penyembuhan.

2.5 Alat dan Bahan

2.5.1 Alat

Alat uji yang digunakan antara lain: pengukur gula darah, *autoclave*, aluminium foil, batang pengaduk, botol kaca penyimpanan, bunsen spiritus, cawan petri, cotton swab steril, erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, glukosa test (autocheck), gunting, *hotplate*, inkubator, kapas, kasa, kertas perkamen, kertas pH meter, kertas saring, *magnetic stirrer*, *laminar air flow* (LAF), mortar, mikropipet, *microplate 96 wells*, mikroskop, pipet tetes, penggaris, pisau bedah, plastik wrapping, rak tabung reaksi, stamper, spuit 1cc, tabung ukur, timbangan digital, tabung reaksi, *viscometer Brookfield*.

2.5.2 Bahan

Bahan uji adalah aloksan, aquadest, ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* L. Merr), etanol swab, gliserin, HPMC (*hydroxypropyl methycellulose*), isolat klinis murni *Staphylococcus aureus*, kristal violet, antibiotik klindamisin gel 1%, mencit jantan (*Mus musculus*), metil paraben, *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), pakan mencit dan *virgin coconut oil* (VCO).

2.6 Prosedur Penelitian

2.6.1 Penyediaan Sampel

Sampel ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* L. Merr) diperoleh dari Laboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur, telah melewati proses determinasi tanaman dan identifikasi senyawa metabolit sekunder oleh peneliti sebelumnya.

2.6.2 Pembuatan Media dan Kultur Bakteri

Proses penyediaan sampel Isolat klinis didapat dari Pusat Kolaborasi Riset (PKR) biofilm di Universitas Gajah Mada, setelah diperoleh sampel isolat lalu pembuatan media *Nutrient Agar* (NA), digunakan untuk mengisolasi dan menumbuhkan isolat bakteri. Ditimbang bubuk (NA) sebanyak 2,8 gram, dimasukkan kedalam erlenmeyer ditambahkan aquadest 100 mL kemudian aduk menggunakan batang pengaduk dan dipanaskan diatas hot plate hingga larut dan mendidih, selanjutnya di sterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit suhu 121°C. Media dituang ke dalam cawan petri dan disimpan di suhu ruangan hingga memadat. Jika sudah memadat Setelahnya diambil koloni bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan ose ke media NA (*Nutrient Agar*) dengan melakukan metode penggoresan pada permukaannya secara zig – zag lalu di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator (Siti Juariah & RiskaTiana, 2021).

Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB), digunakan untuk mengkultur bakteri. Timbang NB sebanyak 1,3 gram, dimasukkan kedalam erlenmeyer ditambahkan aquadest 100 mL. Selanjutnya media dipanaskan pada hot plate sampai homogen. Setelahnya disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah dingin kemudian NB dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL. selanjutnya diinokulasi, diambil koloni bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan inokulan masukkan kedalam media NB (*Nutrient Broth*). Lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator (Ivada Octaviani *et al.*, 2022)

2.6.3 Uji Aktivitas Antibiofilm

Uji aktivitas antibiofilm dapat dilihat dari hasil fase pertengahan 24 dan fase pematangan 48 jam, proses penelitian biofilm pada fase pertengahan diinkubasi selama 24 jam dan fase pematangan dilakukan inkubasi selama 48 jam. Pada uji aktivitas antibiofilm dilakukan dengan memasukkan media 80 µL kedalam sumuran *wells plate* 96, selanjutnya dimasukkan 5 µL suspensi bakteri ke dalam setiap sumuran pada 96 *well plate*. Kemudian bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit untuk tahap pelekatan. Selanjutnya ditambahkan 15 µL sampel ekstrak sebagai perlakuan dengan konsentrasi (1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,125% v/v) dan sampel kontrol klindamisin 1% b/v dimasukkan ke dalam *wells plate* 96 (Hamzah *et al.*, 2021).

Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk tahap pertengahan dan selama 48 jam untuk tahap pematangan. Kemudian plate dicuci dengan aquades sebanyak tiga kali, kemudian dikeringkan pada suhu ruang selama 5 menit. Dimasukkan sebanyak 125 µL kristal violet 1% ke dalam masing-masing sumur untuk memberi warna pada biofilm yang terbentuk. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya dicuci sebanyak tiga kali dengan air mengalir untuk menghilangkan warna kristal violet yang terdapat pada *plate*, selanjutnya ditambahkan 200 µL etanol 96% ke dalam masing-masing sumur.

Baca nilai serapan (OD) menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Pengujian dilakukan sebanyak empat rangkap pada pelat sumur. % Penghambatan pertumbuhan = $\frac{(\text{OD rerata kontrol negatif} - \text{OD rerata sampel uji})}{\text{OD rerata kontrol negatif}} \times 100\%$ Konsentrasi sampel yang menghambat minimal 50% pembentukan biofilm dinyatakan sebagai MBIC₅₀ (*Minimal Biofilm Inhibition Concentration*) (Hamzah *et al.*, 2021).

2.6.4 Formulasi Nano Gel Ekstrak Bawang Dayak

Formula ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* L. Merr) dibuat dalam bentuk sediaan nanoemulsi dan sediaan nano gel. Adapun formulanya dapat dilihat pada Tabel 2.1 dan Tabel 2.2.

Tabel 2.1 Formula Nanoemulsi Ekstrak Bawang Dayak

Komposisi	Manfaat	Konsentrasi
Ekstrak bawang dayak	Bahan aktif	560
Tween 80	Fase minyak	7%
PEG 400	Surfaktan	2%
VCO	Ko surfaktan	1%
Aquadest	Pelarut	100%

Formula nanoemulsi ekstrak bawang dayak Nanoemulsi dibuat dengan mencampurkan Tween 80 sebagai fase minyak dengan VCO ko-surfaktan dan PEG 400 sebagai surfaktan diaduk dengan pengaduk magnetik selama 2 jam dengan kecepatan 100 rpm, selanjutnya tambahkan 100 ml aquades dan homogenkan kembali selama 1 jam (Listyorini *et al.*, 2018).

Tabel 2.2 Formula Gel Ekstrak Bawang Dayak Dengan Konsentrasi 5%, 10%, 15%

Bahan	Manfaat	Konsentrasi Formula Gel		
		Formula 1	Formula 2	Formula 3
Nanoemulsi Ekstrak	Bahan Aktif	5%	10%	15%
HPMC	Pembentuk Gel	1,90	1,90	1,90
Metil Paraben	Pengawet	0,02	0,02	0,02
Gliserin	Humektan	10	10	10
Air Suling	Pembawa	100	100	100

Formula basis gel dengan konsentrasi beragam Formula gel dibuat dengan melarutkan bahan HPMC menggunakan aquadest dengan suhu 75-80^o C gerus hingga menjadi basis. Kemudian tambahkan metil paraben dan gliserin gerus ad homogen, lalu tambahkan ekstrak dengan konsentrasi berbeda gerus ad homogen hingga terbentuk nano gel (Edityaningrum *et al.*, 2022).

2.7 Uji Karakteristik Sediaan Nano Gel

2.7.1 Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan secara visual dan lihat langsung dari bentuk, warna, baunya dari nanogel yang dibuat. Biasanya nano gel bening dengan konsentrasi semi padat (Andini *et al.*, 2023).

2.7.2 Uji pH

Pengujian dilakukan dengan melarutkan sediaan sebanyak 1 gr dengan 10 ml air suling dan dimasukkan kertas pH ke dalam sediaan gel dan lihat nilai pH yang dihasilkan. Nilai pH yang baik pada kulit pH 4,5-6,5 (Andini *et al.*, 2023).

2.7.3 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara sampel nano gel dioleskan pada sepotong kaca atau bahan transparan lain yang sesuai, Sediaan harus menunjukkan komposisi yang seragam dan tidak ada butiran yang terlihat kasar (Andini *et al.*, 2023).

2.7.4 Uji Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan *viskometer Brookfield* dengan menuangkan sampel ke dalamnya Gelas ukur 100 ml, menggunakan kecepatan 50 rpm. Viskositas sediaan nano gel yang baik berkisar antara 500-10000 cP (Andini *et al.*, 2023).

2.7.5 Uji Daya Sebar

Sebanyak 0,5 g sediaan nano gel ditempatkan pada kaca dan didukung dengan gelas lain di atas sediaan nano gel. Diameter nanogel dihitung berdasarkan Panjangnya diameter beberapa sisi dan Tambahkan beban seberat 50, 100, 150 dan biarkan 1 menit. Setiap beban tambahan diukur diameter nanogel seperti sebelumnya. Daya sebar nanogel yang baik yaitu 5-7cm (Andini *et al.*, 2023).

2.7.6 Uji Daya Lekat

Timbang sediaan gel 0,25 g lalu ditempelkan pada kaca objek ditutup kembali dengan benda kaca lainnya. Kemudian ditekan dengan berat 1 kg selama 5 menit. Selanjutnya memasang alat uji yang telah disediakan dengan berat 80 gram. Kekuatan rekat dilihat dari waktu yang dibutuhkan kedua benda kaca tersebut dilepaskan dan kemudian dicatat waktu yang diperoleh dari hasil tes. Ada daya rekat yang baik tidak kurang dari 4 detik (Edityaningrum *et al.*, 2022).

2.7.7 Uji Partikel

Pengukuran ukuran partikel nano gel dilakukan dengan menggunakan sebuah alat bernama *Particle Size Analyzer (PSA)*. Horiba Scientific-100 SZ Sebanyak 3 mL nanoemulsi dimasukkan pada kuvet dan diletakkan dalam alat PSA agar dilakukan pengukuran droplet, nilai baik ukuran partikel yakni dalam rentang 20-500 nm (Sumaiyah and Febia Sari, 2023) (Indalifiany *et al.*, 2021).

2.8 Analisis Data

Aktivitas antibiofilm dapat dianalisis dengan dua metode antara lain dengan pembacaan nilai (OD) dan hasil analisis menggunakan rumus :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{(\text{OD rerata kontrol negatif} - \text{OD rerata sampel uji})}{\text{OD rerata kontrol negatif}} \times 100\%$$

Konsentrasi sampel yang menghambat minimal 50% pembentukan antibiofilm dinyatakan sebagai MBIC₅₀ (Hamzah *et al.*, 2021). Selanjutnya untuk menganalisis luaran klinis pada hewan uji yang mengalami ulkus diabetikum dapat dianalisis dengan pengamatan atau monitoring durasi waktu penyembuhan dan morfologi (Azizah & Qomariyah, 2022).