

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilaksanakan ialah penelitian eksperimental dengan mencakup penyiapan, identifikasi sampel, pembuatan ekstrak, pembuatan sediaan nanogel. Selanjutnya dilakukan Uji aktivitas penghambatan biofilm *S. aureus* mempergunakan teknik *tissue culture plate/microtiter plate biofilm assay*

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek

Subjek penelitian ini adalah bakteri *staphylococcus aureus*

2. Objek

Objek yang digunakan pada penelitian ini adalah Formulasi Nanogel ekstrak spons *petrosia sp* dan hewan uji berupa mencit jantan

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Laboratorium Kimia, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari – Juni 2023.

D. Definisi Operasional

1. Definisi Operasional

a. Spons Genus *Petrosia* ialah termasuk jenis spons yang mempunyai aneka senyawa bioaktif, diantaranya asam kortikatat selaku antijamur dari spons *Petrosia cortikata* (Soediro, 1999), sementara menurut Soest dan Braekman (1999) menemukannya beberapa senyawa bioaktif dari famili Petrosidae misalnya

polihidroksilat asetilin, siklik 3-alkilpiperidin, serta siklopropenasterol.

- b. Dilakukan pembuatan sediaan nanogel ekstrak spons petrosia sp 96%
- c. Eritema merupakan kemerahan pada kulit yang disebabkan pelebaran pembuluh kapiler yang reversible.
- d. Uji penghambatan pembentukan biofilm adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui efektivitas formulasi nanogel ekstrak spons *petrosia sp 96%* dalam menghambat pembentukan biofilm *staphylococcus aureus*.

2. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas yaitu konsentrasi yang digunakan untuk membuat formulasi dari sediaan nanogel spons Petrosia
- b. Variabel terikat yaitu daya hambat yang dimiliki oleh sediaan nanogel spons Petrosia
- c. Variabel terkontrol yaitu jenis hewan coba, bakteri uji, dan waktu pemberian.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian ialah pisau, gelas kaca, corong kaca, aluminium foil, rotary evaporator, kertas saring, timbangan analitik, batang pengaduk, mikropipet, mortar, stemper, gelas ukur, kertas perkamen, magnetic stirrer, microplates, Particle Size Analyzer (PSA) - 100, pH meter, viskometer Oswald, MLAB, kandang, pakan, minuman, vortex, dan pisau bedah.

2. Bahan

Hewan uji: Mencit jantan; spons petrosia; *Staphylococcus aureus*; BrainHeart Infusion (BHI); Kristal violet; Metanol; Isoprofil Miristat (IPM); tween 80; span 80; Karbopol 940; aloksan, aquades ;Metil paraben; NaCl; Glyserin; VCO.

F. Metode Pengumpulan Data

1. Pengambilan Sampel

Sampel dipakai dalam penelitian adalah spons *petrosia*.

2. Determinasi Spons *Petrosia sp.*

Determinasi spons petrosia di lakukan dengan cara mencocokkan cirinya morfologi yang ada pada spons terhadap data kepustakaan.

3. Ekstraksi Spons *Petrosia sp.*

Dilaksanakan secara maserasi bertingkat mempergunakan n-heksana, etil asetat, metanol, dan aquadest. Serbuk direndam dalam pelarut selama 24 jam sambil diaduk. Berikutnya, disaring menggunakan corong buchner. Filtrat diuapkan. Ampas diremaserasi dengan pelarut yang sama (24 jam), disaring dan diuapkan kembali. Ampas hasil rendaman diangin-anginkan dan mulai direndam dengan pelarut selanjutnya sesuai prosedur sebelumnya.

4. Uji aktivitas antibakteri terhadap *staphylococcus aureus*

Tahapan awal dalam menguji dipakai teknik cakram kertas yakni kertas cakram yang diameternya 6 mm dimasukkan kedalam larutan spons uji selanjutnya diletakkannya diatas permukaan media MHA kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C (Ortez, 2005). Setelah terlihat zona bening dilakukannya pengujian lanjut memakai teknik sumur. Larutan spons uji dievaporasi hingga kering selanjutnya dilarutkannya memakai etanol 4 ml, selanjutnya dimasukkannya kedalam 3 sumur dengan diameter 6 mm. Sumur ke empat diisi etanol selaku kontrol positif serta sumur kelima diisi memakai larutan kloramfenikol selaku kontrol positif. Berikutnya dilakuka inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

5. Uji hambatan yang membentuk biofilm fase pertengahan (24 jam) serta pematangan (48 jam) menggunakan teknik *microbroth dilution*.

Dalam menilai kepengaruhannya isolat uji pada pembentukannya biofilm *P. aeruginosa*, dipakai *microtiter plate polystyrene flat bottom 96-well*

(Pierce dkk., 2010). Sebanyak 100 μ L suspensi *P. aeruginosa* (107 CFU/mL) dimasukkan pada tiap *wells microtiter plate* selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu \pm 37°C selama 90 menit. Selanjutnya *plate* dicuci memakai 150 μ L aquades steril tiga kali guna menghilangkannya sel-sel yang tidak melekat. Sebanyak 100 μ L media yang memiliki kandungan isolat murni saponin dengan seri konsentrasi (1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125% b/v), dimasukkan kedalam sumuran yang sudah dibersihkan. Selaku kontrol media dipakai media tanpa pertumbuhan bakteri, serta suspensi bakteri menjadi kontrol negatif. Selaku kontrol positif dipergunakan suspensi bakteri yang ditambahkan antibiotik gentamisin kadar 1% b/v. *Plate* selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam supaya terbentuk biofilm fase pertengahan dan selama 48jam agar membentuk biofilm fase pematangan. Berikutnya *plate* dibersihkan memakai air suling 3x, dan dikeringkan pada suhu ruang selama 5 menit supaya tidak ada sisa air. 125 μ L larutan *kristal violet* 1 % dimasukkan kedalam tiap *wells* supaya memberi warna biofilm yang sudah dibentuk, baik sel mati atau sel hidup selaku komponen yang menyusun biofilm, selanjutnya menginkubasi pada suhu ruang. Selanjutnya *microplate* dibersihkan menggunakan air mengalir 3x supaya menghilangkan sisa kristal violet dan dimasukkan 200 μ L etanol 96 % pada tiap sumuran supaya mencairkan biofilm yang ada. Pembacaan *Optical Density* (OD) dilaksanakan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Nilai OD berikutnya *dipergunakan* dalam memperhitungkan persentase hambatan pada persamaan dibawah ini :

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

Kadar sampel yang bisa menghambat minimal 50 % pembentukan biofilm dianggap *Minimal Biofilm Inhibition Concentration* MBIC50 (Hamzah et al., 2021).

6. Pembuatan Formulasi Nanogel Spons *Petrosia*

Sebanyak 150 mg ekstrak Spons *petrosia* dilarutkannya pada 9mL metanol memakai magnetic stirrer yang kecepatannya 800 rpm pada suhu 50°C. Fase minyak dibuat denganmenambahkannya 6 mL isopropyl miristat (IPM) pada larutan ekstrak hingga homogen. Faseminyak dicampurkan dengan 27,5 mL tween 80 dan 15,5 mL metanol diaduk dengan kecepatan magnetic stirrer 1000 rpm pada suhu 50°C selama 3menit. Larutan tersebut dikombinasikan dengan 30 mL aquadestilata sedikit demi sedikit dan diaduk sampai homogen. Nanogel dibiarkan 24 jam sampai jernih. Massa gel terbentuk dari taburan setiap formula 0,5; 1; 1,5; gram karbopolpada mortir hangat, digerus kemudian dimasukkan 9 mL air dan metilparaben yang terlarut pada 3mL metanol.

7. Uji Karakteristik

a. Pengukuran Droplet Size Nano Emulgator

Pendistribusian ukuran partikel dan rata-rata droplet nanogel diukur menggunakan teknik DLS serta alat yang dipergunakan ialah Particle Size Analyzer (PSA) Horiba Scientific-100 SZ Sebanyak 3 mL nanogel dimasukkan pada kuvet selanjutnya pada PSA supaya dilakukan pengukuran pada droplet. Pengukuran dilaksanakan 3x pada tiap formula (Lysa Oktaviani 2020 t.t.).

b. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptik dilaksanaka pengamatan langsung bentuk, warna, serta baunya dari gel yang jernih dan setengah cair. Pemeriksaan dilakukan secara visual sebelum dan setelah perlakuan uji stabilitas melalui pengambilan sebanyak 0,25 gr pada diuji serta diketahuisifatnya (Ramadhan, 2016).

c. Uji pH

Terdapat 0,5 gr sediaan dilarutkan menggunakan 5 ml aquades, selanjutnya pH stik dicelup selama 1 menit. Warna yang berubah menunjukkannya nilai pH dari Nanogel (Lysa

Oktaviani.,2020).

d. Uji Homogenitas

Sediaan nanogel bagian atas, tengah, dan bawah diambil 0,25 gram selanjutnya diletakkannya pada plat kaca selanjutnya digosokkan serta diraba untuk diketahui serta dirasakan rata ataupun tidak sediaan (Naibaho dkk, 2013).

e. Uji Visikositas

Sebanyak 100 mL sediaan nano emulgel diukur memakai viskometer Ostwald. Angka yang didapati akan terlihat pada layar, selanjutnya dibaca pada skala pada viskometer tersebut (Lysa Oktaviani.,2020).

f. Uji pra klinis

1) Persiapan hewan percobaan

Tiga ekor mencit Jantan dengan berat sekitar 24-26 gram diaklimatisasi selama 30 hari sebelum penelitian dimulai, diberikan makanan serta minuman serta diberi kepuasan sebelum diberikan perlakuan. Selama diperlakukan hewan tersebut sama sekali tidak diberikan makanan maupun minuman.

2) Pembuatan sediaan dosis aloksan

Dosis aloksan secara intraperitoneal yang dipergunakan dalam membuat diabetes pada mencit sebesar 3 mg/kg BB

3) Induksi Diabetes pada mencit

Mencit yang sudah ditimbang diberi kepuasan selama 16 jam. Kemudian untuk mengukur kadar glukosa darah pada hari pertama dilaksanakan pengambilannya darah awal sebelum diberikan perlakuan. Selanjutnya dilaksanakan pengukuran darah awal (T_0) dan didapatkan kadar gula darah pada mencit dengan berat 24 g sebesar 41 mg/dl dan 48 mg/dl pada berat mencit 26 g. Pada hari itu juga diberi larutan aloksan monohidrat 3mg/20 g BB mencit secara i.p. Sesudah 3 hari proses induksi menggunakan larutan aloksan mengalami

kenaikan berat badan dan kadar gula darahnya, diambil darahnya (T_1) dengan kadar gula darah pada berat mencit 26 g sebesar 313 mg/dl dan 340 mg/dl pada mencit dengan berat 27 g .

4) Pengambilan darah pada mencit

Sebelum pengambilan darah, ekor mencit terlebih dahulu dibersihkan menggunakan alcohol 70%, kemudian diambil darah melewati ujung ekor mencit ditoreh dengan memakai pisau bedah kecil sehingga membentuknya sayatan serta mengukur kandungan glukosa menggunakan glucometer easy touch. Darah mencit diujung ekor diteteskan pada strip glukosa yang sudah ditambahkan pada glucometer. Selanjutnya tunggu beberapa detik hingga bisa diketahui kadar gula darah. Angka yang diperlihatkan adalah nilai konsentrasi kadar gula darah dalam satuan mg/dL.

5) Prosedur luka ulkus diabetikum

Rambut mencit dibersihkan hingga bersih lalu dicukur bagian paha setelah itu dibersihkan menggunakan alcohol 70%, selanjutnya disayat 0,5 cm menggunakan pisau pada bagian paha dalam. Luka yang telah ada dilekatkan bakteri *S. aureus* sebanyak 2 ose dan dilakukan pengamatan 1 x 24 jam fase pertengahan pembentukan biofilm pada bakteri dan diamati Kembali pada 1x 48 jam pada fase pematangan bakteri. Dilakukan pengolesan sediaan uji (formulasi nanogel ekstrak spons *petrosia sp.*). Pada hari berikutnya diamati dan didokumentasikan kondisi luka ulkus. Dilakukan 2x/ hari hingga luka sembuh dan mengering dengan indikator tidak adanya eritema disertai keluarnya pigmen kuning yang disebabkan oleh bakteri *S.aureus* pada luka dan penyebaran luka oleh bakteri yang telah dihambat oleh bahan uji.

G. Teknik Analisis Data

1. Rendemen Ekstrak

Rendemen dianalisis dengan menghitung presentase ekstrak menggunakan rumus perhitungan rendemen.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

2. Pembacaan nilai OD hasil analisis menggunakan rumus yaitu :

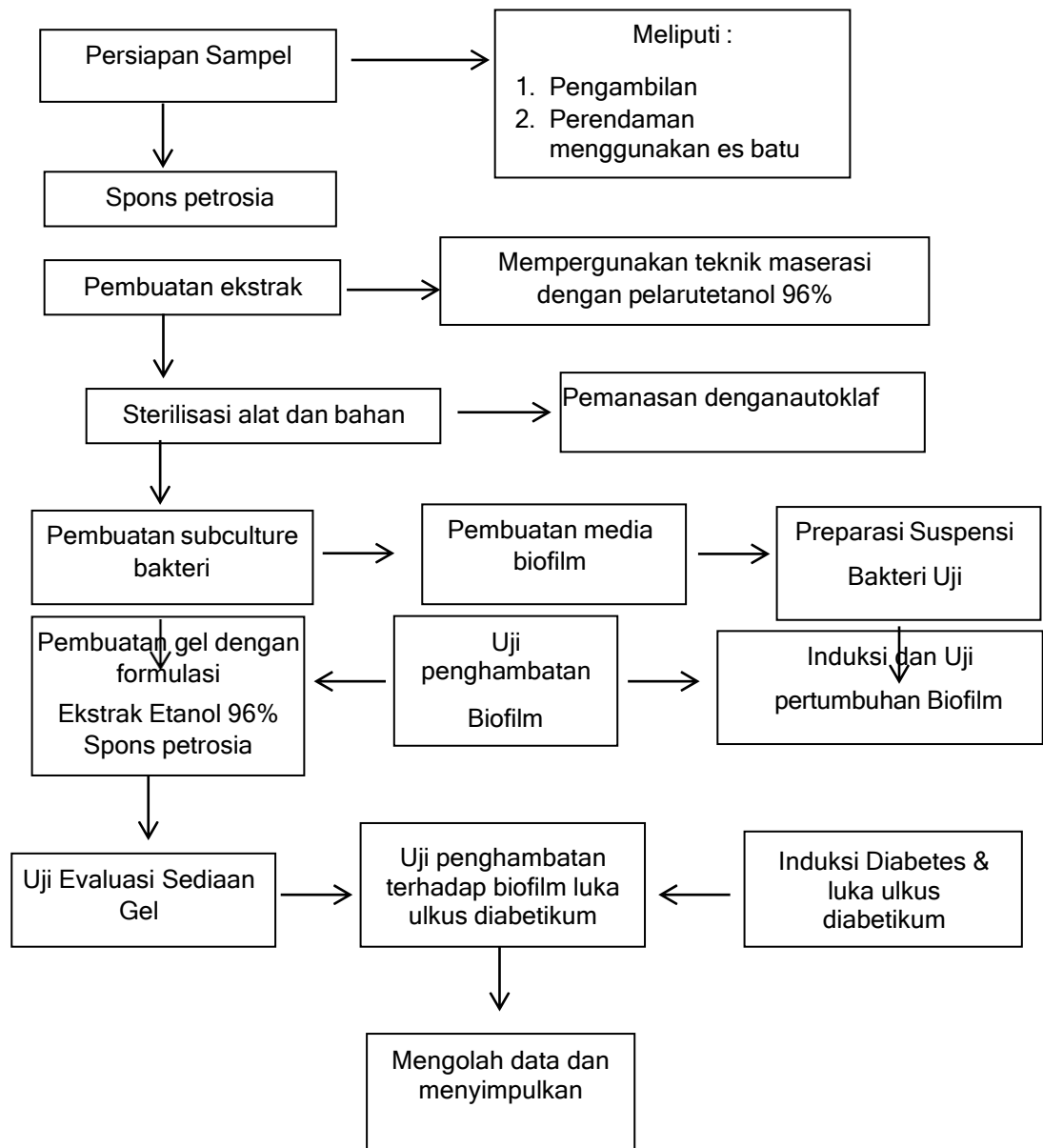
$$\text{Penghambatan} = \frac{\text{OD Rerata kontrol negatif} - \text{OD rerata sampel uji}}{\text{OD rerata kontrol negatif}} \times 100\%$$

3. Kadar sampel yang dapat menghambat 50% pembentukan biofilm dianggap menjadi MBIC (Hamzah dkk.,2019).

H. Etika Penelitian

Penelitian ini mengikuti kaidah yang sesuai terhadap etika penelitian yang sudah ditetapkannya pada hewan uji. Pembuatan etika clearance dilakukan di Universitas Brawijaya.

I. Alur Jalannya Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Jalannya Penelitian

J. Jadwal Penelitian

Tabel 3. 1 Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Bulan						
		Okt 2022	Nov 2022	Des 2022	Jan 2023	Feb 2023	Mar - Jun 2023	Jul 2023
1.	Penusunan proposal							
2.	Seminar proposal							
3.	Pengambilan sampel							
4.	Ekstraksi							
5.	Uji Penghambat biofilm							
6.	Pembuatan Nano Gel							
7.	Induksi Ulkus diabetikum kepada mencit							
8.	Analisis data							
9.	Penulisan skripsi							
10.	Seminar hasil							