BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dengan jadwal sesuai pada Tabel 1 dibawah ini :

Tabel 1. Tabel waktu penelitian

JADWAL KEGIATAN			BULAN KE-					TEMPAT
			1	2	3	4	5	
1		**Tahap Persiapan**						
	a	Penyiapan alat	√					
	b	Penyiapan bahan	√					
	c	Persiapan Formulasi	√					
2		**Tahap Penelitian**						
	a	Optimasi dan formulasi patch		√				Laboratorium FKIK UMY
	b	Uji karakteristik patch			√			Laboratorium FKIK UMY
	c	Uji in vitro				√		Laboratorium FKIK UMY
	d	Pengamatan			√	√		Laboratorium FKIK UMY
3		**Tahap Penyelesaian**						
	a	Pengumpulan data penelitian		√	√	√		Laboratorium FKIK UMY
	b	Pengolahan data			√	√		Laboratorium FKIK UMY
	c	Analisis data				√	√	Laboratorium FKIK UMY
	d	Penyusunan laporan akhir					√	
	e	Pengumpulan laporan akhir					√	

C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variable Penelitian

a. Variable Pengaruh

Komposisi HPMC dan PVP dalam formula patch, yaitu: 3:1, 6:1, 9:1, 12:1, 15:1.

b. Variabel Terpengaruh

1) Karakteristik Patch

Hasil analisis karakteristik patch yaitu pemerian fisik, keseragaman bobot, keseragaman ketebalan, dan *% swelling*.

2) Daya Antibakteri

Diameter hambat pertumbuhan *Streptococcus sanguis.*

c. Variabel Terkendali

Konsentrasi amoksisilin dan suhu *swelling test.*

d. Variabel Tak Terkendali

Jumlah pelarut etanol 96%, suhu ruangan, kelembaban udara, kecepatan pengadukan dan waktu yang dibutuhkan patch untuk mengering.

2. Definisi Operasional

a. Komposisi HPMC dan PVP adalah perbandingan jumlah antara HPMC dan PVP yang digunakan dalam tiap formula patch.

b. Keseragaman bobot merupakan hasil intepretasi data statistik dari 20 pengukuran bobot individual patch yang dipresentasikan sehingga $\bar{x} \pm$ SD.

c. Keseragaman ketebalan merupakan hasil intepretasi data statistik dari 10 pengukuran dimensi ketebalan individual patch yang dipresentasikan sehingga $\bar{x} \pm SD$.

d. *Swelling* adalah kemampuan material untuk menyerap NaCl fisiologis pada suhu 37°C dalam waktu 1,5 menit dan dinyatakan dalam %.

e. Diameter hambat adalah ukuran daerah disekitar titik aplikasi sampel uji yang tidak ditumbuhi bakteri.

f. Konsentrasi amoksisilin adalah persentase kadar amoksisilin yang dimuat dalam sediaan patch.

g. Suhu uji *swelling* adalah ukuran suhu dalam pengujian *swelling* yaitu 37°C.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan berupa pipet ukur, pipet tetes, pinset, gelas beker (Iwaki pyrex®), gelas ukur (Iwaki pyrex®), labu takar (Iwaki pyrex®), gelas arloji (Iwaki pyrex®), *water bath* (Memmert), oven, labu Erlenmeyer (Iwaki pyrex®), tabung reaksi, kapas, tissue, pinset, penggaris, micrometer (Herma®), pipet volume, pipet tetes, mikro pipet, *paper disk*, batang L, sarung tangan, masker, timbangan digital, kertas saring, kompor listrik, bunsen dan kertas label.

2. Bahan Penelitian

Antibiotik amoksisilin Amoxsan® (PT. Sanbe Farma), HPMC *pharmacetical grade* (E-merck), PVP *pharmacetical grade* (E-merck), gliserin *pharmaceutical grade* (Brataco), etanol 70% (General lab), etanol 96% (General lab), aquadest (General lab), aquadest steril (General lab), *peppermint essens food grade*, NaCl fisiologis (PT.Otsuka), *Streptococcus sanguis*, TSA, BHI.

E. Prosedur Penelitian

1. Formulasi Patch Amoksisilin

Formulasi sediaan patch menggunakan amoksisilin sebagai zat aktif obat. Sebagai polimer digunakan HPMC dan PVP dengan perbandingan 3:1, 6:1, 9:1, 12:1, 15:1. Formula tersebut didapatkan dari hasil *trial and error* yang dilakukan sebelumnya, dimana formula dengan perbandingan 1:1 dan 2:1 ketika sudah dikeringkan dan dicetak, patch susah di lepas dari cetakan dan ketika ditekuk patch mudah patah, oleh karena itu formula dipilih seperti yang tersaji pada Tabel 2. Bahan tambahan lainnya adalah gliserin sebanyak 2 tetes sebagai humektan. Gliserin ini ditambahkan agar patch yang terbentuk lebih lembab sehingga tidak mudah patah ketika ditekuk. Selain itu bahan tambahan lainnya yaitu *peppermint essens* sebanyak 2 tetes ditambahkan sebagai penambah rasa dan aroma. Metode *solven casting* akan digunakan dalam pembuatan formulasi ini. HPMC dan PVP dilarutkan dengan etanol dan dengan penambahan aquadest. Setelah HPMC dan PVP membentuk gel, ditambahkan amoksisilin dan semua bahan tambahan, kemudian dicampur

menjadi satu hingga homogen. Bahan yang sudah homogen dituangkan ke dalam cawan petri dan dikeringkan pada suhu ruangan sampai terbentuk lapisan film. Patch dibuat dengan diameter 0,5 cm dan ketebalan tidak lebih dari 1,5 mm.

Dalam pembuatan kontrol negatif (Non 1, Non 2, Non 3, Non 4 dan Non 5) juga menggunakan metode *solven casting*. HPMC dan PVP dilarutkan dengan etanol dan dengan penambahan aquadest. Setelah HPMC dan PVP membentuk gel, ditambahkan semua bahan tambahan, kemudian dicampur menjadi satu hingga homogen. Bahan yang sudah homogen dituangkan ke dalam cawan petri dan dikeringkan pada suhu ruangan sampai terbentuk lapisan film. Patch dibuat dengan diameter 0,5 cm dan ketebalan tidak lebih dari 1,5 mm.

Tabel 2. Rancangan formula patch

Formula (F)	Komponen				
	Amoksisilin	**HPMC**	**PVP**	**Essen Pappermint**	**Gliserin**
F1	0,93 %	72,4%	24,1%	2,5%	2 tetes
F2	0,93 %	82,7%	13,8%	2,5%	2 tetes
F3	0,93 %	86,8%	10,7%	2,5%	2 tetes
F4	0,93 %	89%	7,4%	2,5%	2 tetes
F5	0,93 %	90,5%	6%	2,5%	2 tetes
Non 1	-	72,4%	24,1%	2,5%	2 tetes
Non 2	-	82,7%	13,8%	2,5%	2 tetes
Non 3	-	86,8%	10,7%	2,5%	2 tetes
Non 4	-	89%	7,4%	2,5%	2 tetes
Non 5	-	90,5%	6%	2,5%	2 tetes

2. Uji Karakteristik Fisik Patch

a. Pemeriksaan Fisik

Setiap patch yang dihasilkan dari tiap formula diamati warna, *transparancy/opacity*, dan homogenitas fisik masing-masing serta reprodusibilitas hasil pada replikasi formula.

b. Uji Keseragaman Bobot

Sebanyak 20 potong patch ditimbang satu per satu. Kemudian keseragaman bobot ditentukan sebagai representasi dari keseragaman dosis yang dimuat dalam tiap lembar patch dengan anggapan terdistribusi secara homogen. Dari 20 patch yang ditimbang, dihitung rata-rata bobot patch, tidak boleh lebih dari 2 patch yang masing-masing bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih dari 15%, dan tidak satu patch-pun yang bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih dari 30%.

c. Uji Keseragaman Ketebalan

Sebanyak 10 potong patch diukur tebalnya menggunakan mikrometer. Keseragaman ketebalan ditentukan dengan menghitung rata-rata ketebalan patch dan menghitung koefisien variansi (CV).

d. *Swelling test*

Untuk mengetahui besarnya *% swelling* patch digunakan NaCl fisiologis sebagai analog cairan tubuh. Patch sebagai berat kering (*dry weight* atau Wd) diletakkan ke dalam *test tube* kemudian 1,0 mL NaCl fisiologis ditambahkan ke dalam masing-masing *test tube*. Sampel kemudian diinkubasi dengan interval waktu 1,5 menit pada suhu 37°C.

Setelah dikeluarkan dari inkubator, NaCl fisiologis dibuang dan sampel dibilas menggunakan aquadest tiga kali. Sampel diletakkan di atas kertas adsorben untuk menghilangkan air yang menempel sebelum ditimbang berat basahnya (*wet weight* atau Ww). Besarnya % *swelling* dapat dihitung menggunakan Persamaan 1.

3. Uji Daya Anti Bakteri

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian uji daya antibakteri ini seperti cawan petri, batang pengaduk, labu Erlenmeyer, gelas ukur, labu takar, gelas arloji, tabung reaksi dan spatula disterilkan di dalam oven pada suhu 170°C selama 2 jam. Jarum ose dan pinset disterilkan dengan lampu bunsen.

b. Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan adalah larutan amoksisilin 0,45% dan 0,9%. Larutan amoksisilin 0,45% dibuat dengan cara menimbang 0,5 g amoxan dilarutkan ke dalam 100 mL aquadest steril. Larutan amoksisilin 0,9% dibuat dengan cara menimbang 1 g amoxan dilarutkan ke dalam 100 mL aquadest steril. Larutan kontrol positif diteteskan kedalam *paperdisk* masing-masing sebanyak 30 µL.

c. Pembuatan Kontrol Negatif

Ada 2 kontrol negatif yang digunakan yaitu:

1) Formula patch Non 1, Non 2, Non 3, Non 4 dan Non 5.
2) Aquadest steril diteteskan kedalam *paperdisk* sebanyak 30 µL.

d. Pembuatan Media Agar

Sebanyak 10,5 gr *Trypticase Soy Agar* (TSA) dilarutkan dalam 250 mL aquadest, kemudian dimasukan ke botol/tabung reaksi dan disterilkan di autoklaf suhu 120°C selama 15 menit. Selanjutnya media TSA cair tersebut secara aseptis dituangkan kedalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat.

e. Penyiapan Bakteri

Diambil satu koloni bakteri *Streptococcus sanguis* kemudian dimasukkan ke dalam 1 mL NaCl. Selanjutnya inkubasi selama 2 - 4 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, ambil 1 mL bakteri yang telah diinkubasi yang kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL larutan *Brain Heart Infusion* (BHI) dan dihomogenkan. Berdasarkan perlakuan tersebut maka akan didapat koloni yang mengandung 10^8 CFU/mL larutan bakteri.

f. Uji Daya Anti Bakteri

Diambil 100 µL bakteri 10^8 CFU/ml yang telah diinkubasi menggunakan mikro pipet. Kemudian digoreskan merata pada media TSA padat. *Paperdisk* ditetesi dengan larutan amoksisilin 0,45% dan 0,9% masing-masing sebanyak 30 µL sebagai kontrol positif. *Paperdisk* ditetesi dengan aquadest steril sebanyak 30 µL sebagai kontrol negatif. Selanjutnya *paperdisk* ditempelkan pada permukaan agar. Hal yang sama juga dilakukan pada patch. Patch F1, F2, F3, F4 dan F5 dan patch Non 1, Non 2, Non 3, Non 4 dan Non 5 ditempelkan pada permukaan agar. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Waktu 24 jam

merupakan fase eksponensial bakteri yang ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Sedangkan fase stasioner terjadi pada 48 - 72 jam, dimana pertumbuhan bakteri tidak terjadi lagi. Fase stasioner merupakan saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap (Volk dan Wheeler, 1993). Hasil uji daya antibakteri dilihat dengan mengukur diameter hambatan.

Analisis data dilakukan secara kuantitatif dengan metode statistik parametrik yaitu *One way* ANOVA. *One way* ANOVA digunakan untuk menganalisis data lebih dari 2 sampel yang berbeda dengan tingkat signifikansi 95%. Data disajikan sebagai mean±standar deviasi. Sebelum menggunakan hasil analisis ini sebagai alat pengambil keputusan, harus diuji terlebih dahulu mengenai validitas hasil analisisnya. Untuk dapat mengetahui kevalidannya, maka harus di uji terlebih dahulu asumsi yang mendasari *One way* ANOVA, yaitu: populasi terdistribusi normal, sampel diambil secara acak dari masing-masing populasi, serta variansi semua populasi sama *(homogeneity of variance).* Apabila salah satu asumsi tersebut tidak dipenuhi maka uji ANOVA satu jalur tidak dapat digunakan sebagai alat pengambil keputusan yang valid sehingga harus menggunakan metode statistik non-parametrik yaitu *Kruskal Wallis Test.*