

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian yang digunakan yaitu metode penelitian eksperimental.

#### **B. Tempat dan Waktu**

##### 1. Tempat

Tempat penelitian pembuatan gel minyak atsiri daun Kemangi (*O. basilicum*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY, Laboratorium Kimia Universitas Islam Indonesia dan Teknologi Farmasi Universitas Islam Indonesia

##### 2. Waktu

Waktu penelitian dimulai dari bulan Oktober sampai Desember 2019

#### **C. Definisi Operasional dan Variabel**

##### 1. Variabel Penelitian

###### a. Variabel Bebas

Konsentrasi bahan pembuat gel atau gelling agent HPMC.

###### b. Variabel Tergantung

Uji Kualitas gel (nilai pH, nilai homogenitas, nilai daya lekat, nilai daya sebar, nilai viskositas, uji organoleptis meliputi: warna, bau dan bentuk sediaan) dan aktivitas antibakteri atau zona hambat gel *hand sanitizer*.

###### c. Variabel Terkendali

Suhu inkubator, dan *autoclave*

##### 2. Definisi Operasional

- a. Gel *hand sanitizer* adalah gel yang mampu memenuhi kualitas gel yang ideal, Penggunaan *gelling agent* pada penelitian adalah HPMC.

- b. Varian konsentrasi *gelling agent* adalah 4 gram, 4,5 gram, dan 5 gram.
- c. Sifat fisik dikatakan ideal apabila setiap uji memenuhi syarat meliputi uji organoleptis (meliputi bentuk sediaan, warna, dan bau), pengujian homogenitas (tidak tampak adanya butiran kasar), pH (range 4.3-6,5), daya lekat ( waktu lebih 1 detik), daya sebar (rentang 5-7 cm<sup>2</sup>) dan viskositas (rentang 50 – 1000 dPa.s)
- d. Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*
- e. Pengujian Antibakteri, dilakukan dengan metode sumuran. Dengan kontrol positif adalah gel merk nuvo, kontrol negatif basis gel tanpa minyak atsiri, dan kontrol pembanding adalah basis gel menggunakan minyak atsiri daun kemangi.
- f. Daya hambat antibakteri dapat di klasifikasikan yaitu 10-20 mm artinya memiliki daya hambat kuat, 5-10 mm artinya memiliki daya hambat sedang, <5 mm artinya memiliki daya hambat lemah (Davis *and* Stout, 1971)

#### **D. Instrumen Penelitian**

##### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar, stemper, kompor elektrik, kaca arloji (herma), kaca preparat (sail brand), cawan petri (herma), gelas ukur (pyrex), gelas beker (pyrex), sarung tangan, masker, sudip, pengaduk steinnles/spatula, pipet (pyrex), timbangan analitik, kertas perkamen, alumunium foil(BestFRESH), thermometer, pH universal (McolorpHasr<sup>TM</sup>), timbangan analitik (METTLER TOLEDO), tabung reaksi (pyrex), alat pelubang sumuran, ose, bluetip (onemed), mikropipet (socorex swiss), alat viscometer brookfield DV2T, cotton bud, bunsen, *laminar air flow* (LAF), *autoclave*, dan Inkubator.

##### 2. Bahan

HPMC (Brataco), Metil Paraben (Brataco), Propil Paraben (Brataco), gliserin (Brataco), Minyak Atsiri Daun Kemangi (Happy Green Surabaya), Aquades (Brataco),

alkohol 70% (Brataco) Nutrient TSA (triptone soya oxoid), Nutrient Brooth, NaCl (sodium chloride merck), Bakteri *Staphylococcus aureus*.

## **E. Cara Kerja**

### 1. Minyak Atsiri Daun Kemangi (*O. basilicum*)

Minyak Atsiri Daun Kemangi (*O. basilicum*) di dapatkan dari produsen minyak atsiri di Surabaya dengan nama perusahaan Happy Green.

### 2. Pembuatan Formulasi Gel Minyak Atsiri Daun Kemangi (*O. basilicum*)

Pembuatan gel diawali dengan memanaskan aquades sebanyak 20 ml di dalam beaker glass ukuran 50 ml dengan menggunakan kompor elektrik, sampai suhu aquades 90<sup>0</sup>C-95<sup>0</sup>C yang bisa dilihat dengan thermometer. Aquades yang telah mendidih, ditambahkan sedikit demi sedikit HPMC sambil diaduk menggunakan spatula sampai homogen. HPMC yang sudah larut lalu diangkat dan dibiarkan sampai dingin sampai menjadi basis HPMC (bagian 1). Selanjutnya, aquades 30 ml mendidih dimasukkan ke dalam mortar yang berisi larutan metil paraben dan propil paraben, lalu dihomogenkan dengan menggunakan stemper dan ditunggu sampai keadaan dingin (bagian 2). Bagian 1 dan bagian 2 dihomogenkan menggunakan stemper di dalam mortar. Proses penghomogenan tahap 1 dan 2 tidak boleh terlalu cepat dikarenakan bisa menarik udara dan terjadi gelembung. Kemudian gliserin 5 gram ditambahkan ke dalam larutan tersebut. Untuk Aquades sisa ditambahkan ke basis gel. Minyak atsiri daun kemangi dimasukkan terakhir sebanyak 2 gram ke dalam larutan tersebut, lalu dihomogenkan. Gel yang sudah jadi dimasukkan ke dalam wadah yang sudah disediakan. Volume akhir yang diperoleh adalah ±100 ml. Percobaan yang sama dilakukan dengan konsentrasi HPMC 4,5 dan 5 gram yang ditambah dengan minyak atsiri dan HPMC 4, HPMC 4,5,

dan HPMC 5 yang tanpa menggunakan minyak atsiri. Formulasi gel hand sanitizer dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 1.** Formulasi Gel *Hand Sanitizer*

<b>Bahan</b>	<b>Fungsi</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>F6</b>
Minyak Atsiri (gram)	Zat aktif	-	-	-	2	2	2
HPMC (gram)	Gelling Agent	4	4,5	5	4	4,5	5
Gliserin (gram)	Pembasah	5	5	5	5	5	5
Propilen Paraben (gram)	Pengawet	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Metil paraben (gram)	Pengawet	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Aquades add (ml)	Pelarut	100	100	100	100	100	100

### 3. Uji Kualitas Fisik Sediaan Gel Handsinitizer

Parameter uji kualitas fisik mengacu pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan Afianti dan Murrukmihadi (2015) meliputi:

#### a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis adalah pengujian dengan pancaindra untuk mengetahui bentuk sediaan, warna, dan bau. Uji ini sangat cepat dengan menggunakan indera penglihatan, dan indera penciuman.

#### b. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan cara pH universal dimasukkan kedalam sediaan gel minyak atsiri daun kemangi dan basis gel dengan melakukan 3x replikasi. Sediaan gel pada sediaan topikal harus memiliki pH dengan rentang 4.3-6,5. pH gel minyak atsiri daun kemangi dan basis gel harus sesuai dengan pH normal kulit.

c. Uji Daya Sebar

Uji Daya Sebar dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram sediaan basis gel tanpa minyak atsiri daun kemangi dan gel minyak atsiri daun kemangi. Gel kemudian diletakkan dikaca arloji dengan keadaan ditimpa dan diberi beban 50-500 gram selama 1 menit. Kemudian dihitung diameter luas penyebaran gel dan prosedur tersebut dilakukan replikasi sebanyak 3x.

d. Uji Daya Lekat

Uji Daya Lekat yaitu dengan mengoleskan sediaan di kaca area 2x2 cm sebanyak 0,5 gram, kemudian ditimpa dengan objek kaca lain di atasnya. Kemudian kaca ditimpa dengan beban 1 kg selama 5 menit. Kemudian setelah 5 menit lepaskan beban 1kg dan menurunkan beban 80 gram. Kemudian dihitung waktu lekatan sampai terlepas. Prosedur tersebut dilakukan replikasi sebanyak 3x.

e. Uji Homogenitas

Uji homogenitas yaitu mengoleskan sediaan 0,5 gram basis gel tanpa minyak atsiri dan gel dengan minyak atsiri di kaca preparat. Selanjutnya dilihat apakah terdapat butiran kasar atau tidak. Prosedur tersebut dilakukan replikasi sebanyak 3x.

f. Uji Viskositas

Uji Viskositas yaitu menimbang 0,5 gram sediaan basis gel tanpa minyak atsiri dan gel dengan minyak atsiri ke dalam wadah viskometer Brookfield DV2T. Selanjutnya mengatur kecepatan pada viskometer dalam kecepatan 20 rpm. Kemudian dilakukan waktu pembacaan (maksimal dalam 59 detik). Setelah itu, tombol Run dinyalakan. Ketika waktu habis akan muncul hasil yang tertera di LCD. Hasil dari prosedur tersebut dicatat dan direplikasi sebanyak 3x.

g. Pengujian Antibakteri *Staphylococcus aureus*

1) Sterilisasi Alat

Alat disiapkan seperti : erlenmeyer, tabung reaksi, beaker glass, cawan petri, ose, dan bluetip. Erlenmeyer dan tabung reaksi ditutup dengan kapas pada mulut (rongga yang terbuka), blue tip dimasukkan beaker glass dengan dilapisi aluminium foil. Setelah itu, disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 derajat celcius selama 20 menit dihitung dari suhu *autoclave* yang sudah sampai mencapai 121 derajat celcius. Kemudian cawan petri terlebih dahulu dibungkus menggunakan kertas berwarna coklat kemudian di sterilisasi menggunakan oven 171 derajat celcius dengan 30 menit, sedangkan ose di bakar memakai api bunsen sampai membara (Periadinadi *et al.*, 2015)

2) Pembuatan Agar

Bahan disiapkan yaitu TSA dengan menimbang 8 gram menggunakan timbangan analitik. Selanjutnya, aquades 200 ml dimasukkan ke dalam beaker glass ukuran 500 ml. Setelah itu, aquades dipanaskan dalam *mikrowave* dan setelah mendidih, serbuk TSA dimasukkan sedikit demi sedikit. Kemudian, larutan TSA diaduk menggunakan spatula. Setelah homogen dimasukkan ke dalam erlenmeyer dengan ukuran 20 ml. Mulut erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil. Kemudian, erlenmeyer disterilisasi menggunakan *autoclave* 121 derajat celcius selama 20 menit dihitung dari suhu *autoclave* yang sudah sampai mencapai 121 derajat celcius (Susanto, 2016)

3) Penyiapan Agar di cawan petri

Alat disiapkan yaitu erlenmeyer berisi media TSA yang sudah di sterilisasi dan cawan petri kemudian dimasukkan kedalam LAF. Bunsen dinyalakan dan sisi cawan petri dipanaskan dengan bunsen (teknik aseptis). Kemudian TSA

dimasukkan ke dalam cawan petri. Cawan petri ditutup menggunakan kertas coklat dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin atau lemari es khusus media.

4) Pengembangbiakan Bakteri *Staphylococcus aureus* (pengerjaannya di LAF)

Bahan disiapkan yaitu media nutrient broth steril (media cair) dan bakteri *Staphylococcus aureus* pada agar miring. Setelah itu, ose dipanaskan sampai membara (sterilisasi). Kemudian, ose dimasukkan ke dalam media agar miring tumbuh bakteri *Staphylococcus aureus* dengan cara digoreskan ke media agar. Setelah itu, ose dimasukkan ke dalam nutrient broth steril dengan cara diaduk dalam media nutrient broth lalu diinkubasikan selama 18-24 jam dengan suhu 37°C (Periadinadi *et al.*, 2015).

5) Pengenceran bakteri

NaCl ditimbang sebanyak 0,9 gram dan dimasukkan ke dalam aquadest 100 ml. Setelah itu, 7 tabung reaksi disiapkan masing masing diberi larutan. Tabung reaksi pertama dimasukkan 9 ml larutan NaCl. Tabung reaksi kedua sampai ke-enam dimasukkan 9 ml aquadest. Pengenceran bakteri *Staphylococcus aureus* sampai  $10^6$  CFU/ml. Kemudian, alat disiapkan yaitu Mikropipet ukuran 100-1000  $\mu$ l dan *blue tip*. Setelah itu, tabung reaksi berisi aquadest dan NaCl dan bluetip tersebut di sterilkan menggunakan autoclave 121°C selama 20 menit. Kemudian diangkat dan dimasukkan ke dalam LAF. Nutrient Brooth diambil menggunakan mikropipet 100  $\mu$ l (0,1 ml) yang sudah dipasangkan bluetip dan dimasukkan ke dalam tabung NaCl (tabung pertama). Kemudian tabung pertama di gojog. Larutan dari tabung pertama diambil 0,1 ml dan ditaruh ke tabung kedua yang berisi aquadest steril. Prosedur pengenceran tersebut dilakukan sampai tabung terakhir. Larutan tabung yang terakhir dimasukkan ke dalam beker glass. Setelah itu, diambil 1000  $\mu$ l (1 ml)

memakai mikropipet yang dimasukkan kedalam cawan petri dan diratakan menggunakan alat perata. Kemudian dilakukan pengambilan sampai 9 cawan petri yang berisi agar TSA. Setelah itu, didiamkan selama 3-4 menit agar bakteri menempel pada media. (Periadnadi *et al.*, 2015)

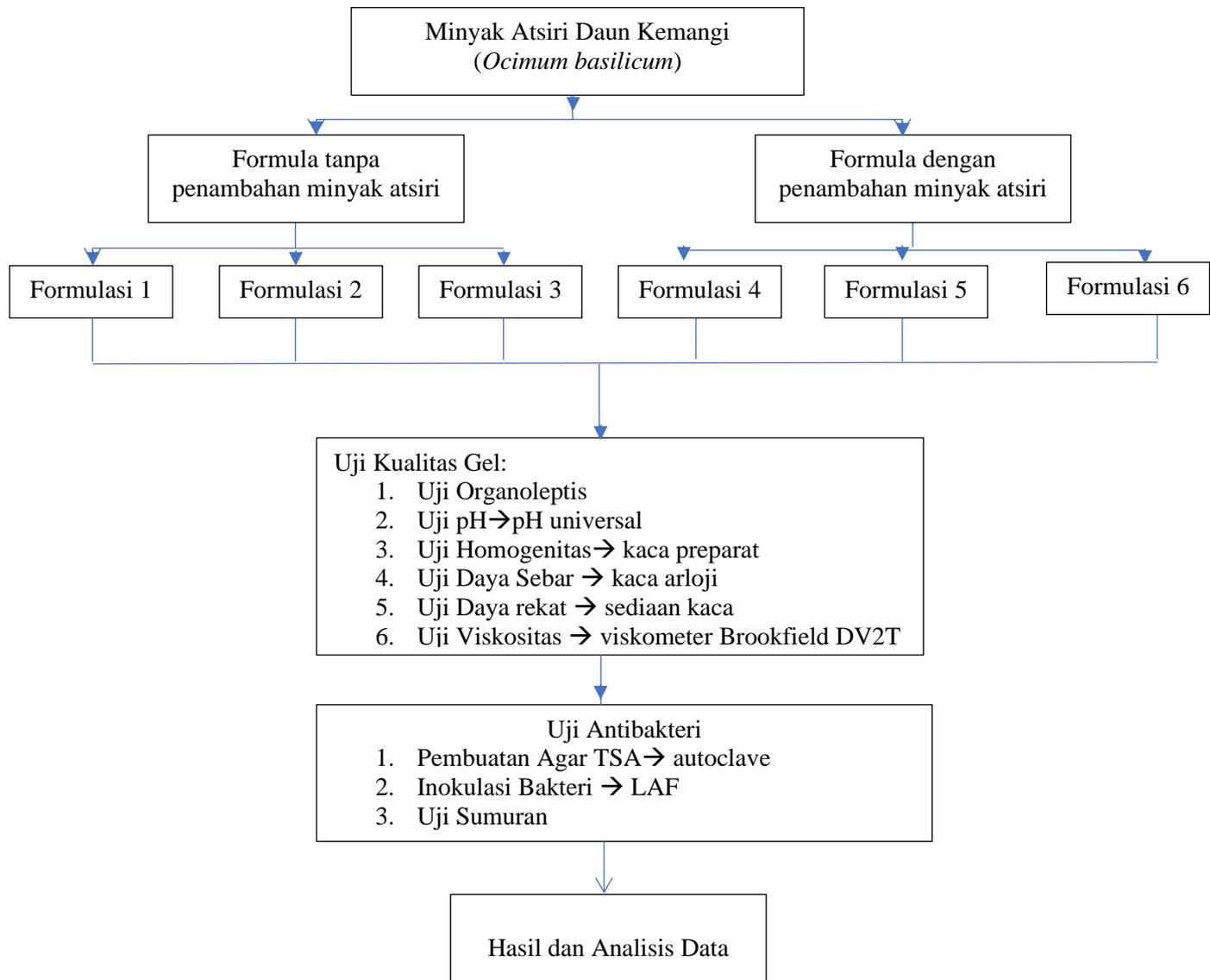
6) Pembuatan Sumuran

Alat sumuran disemprot alkohol 70% dan dipanaskan di api bunsen. Setelah itu, dibuat 5 lubang sumuran pada cawan petri dengan cara mencelupkan atau menekan media agar. Lubang sumuran dibuat sebanyak 5 yang nantinya akan diisi dengan kontrol positif: gel merk nuvo, kontrol negatif: basis gel tanpa menggunakan minyak atsiri, dan pembanding: basis gel menggunakan minyak atsiri. Kemudian masing-masing diisi dengan 0,1 ml dimasukkan ke dalam sumuran. Cawan petri ditandai dengan spidol. Cawan petri diinkubasi dengan suhu 37°C dengan waktu 18-24 jam

7) Perhitungan diameter daya hambat antibakteri

Diameter daya hambat antibakteri terhadap gel minyak atsiri daun kemangi dilakukan dengan mengukur diameter hambat pada media. Alat yang digunakan adalah penggaris. Prosedur tersebut dilakukan replikasi sebanyak 3x.

## F. Skema Penelitian



**Gambar 1. Skema Tahap Penelitian**

## **G. Analisis Data**

Hasil dari optimasi formula dapat dilakukan dengan pengujian kualitas fisik sediaan gel minyak atsiri daun kemangi berupa data yang diperoleh dengan tiga kali replikasi pada pengamatan organoleptis, nilai pH, homogenitas, daya sebar, daya rekat, viskositas dan uji aktivitas bakteri disajikan dalam bentuk simpangan baku.

Uji kualitas fisik sediaan gel dilakukan sebanyak tiga kali replikasi. Rata-rata hasil uji dibandingkan dengan parameter uji kualitas fisik yang dipersyaratkan. Formula dengan hasil uji kualitas fisik yang memenuhi persyaratan dipilih sebagai formulasi terbaik. Untuk uji aktivitas bakteri dihitung diameter daya hambat dari bakteri *Staphylococcus aureus*.