BAB III

METODE PENELITIAN

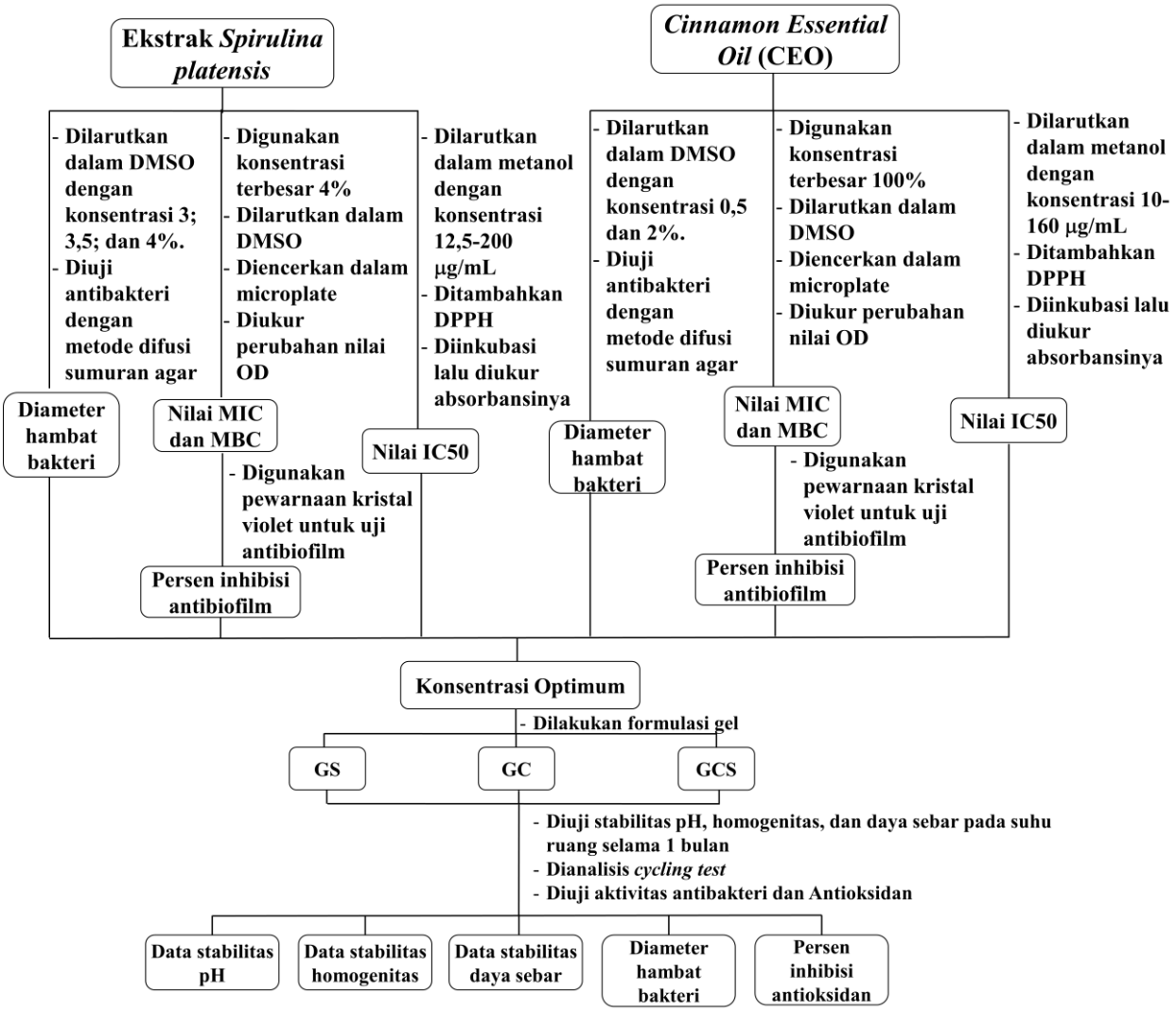
3.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada uji antibakteri diantaranya micropipet, pembakar spirtus, neraca analitik, *hot plate*, inkubator, gelas kimia, labu erlenmeyer, tabung reaksi, laminar dan sonikator. Pada pengujian antioksidan digunakan neraca analitik, labu takar, gelas ukur, pipet tetes, dan batang pengaduk. Pada pembuatan dan uji stabilitas gel digunakan perlatan seperti neraca analitik, *magnetic stirrer*, batang pengaduk, pipet tetes, pelat kaca, *chiller*, anak timbangan, dan pH meter. Instrumen yang digunakan, *microplate reader* SpectraMAX ABS Plus, Spektrofotometer UV-Vis.

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini dijabarkan pada tiap tahapan yang dilakukan. Pengujian antibakteri menggunakan ekstrak *Spirulina platensis* yang telah dikarakterisasi, minyak kayu manis media cair Luria Bertani (LB) dan Brain Heart Infusion (BH) (Himedia), media padat Luria Bertani (LB) dan Brain Heart Infusion (BH) (Himedia), tip mikropipet, microplate 96-well, cawan petri, Dimetil sulfoksida (DMSO) 2% (Merck), aquades, etanol 70%, antibiotik bacitracin (Pharos), kristal violet (Merck), metanol, Phosphate Buffer Saline pH 7, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8939, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Pada pengujian antioksidan menggunakan metanol Pro Analisis (Merck), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Merck). Formulasi dan stabilitas gliserol, akuades, Synthalen K, Trietanolamin.

3.2 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1



Gambar 3. 1 Tahapan penelitian

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Penentuan Konsentrasi Optimum Ekstrak *Spirulina platensis* dan *Cinnamon Essential Oil* melalui Uji Antibakteri, Antibiofilm dan Antioksidan

Penentuan konsentrasi optimum ekstrak *Spirulina platensis* dan *Cinnamon Essential Oil* ditinjau melalui pengujian antibakteri, antibiofilm, dan antioksidan. Pengujian antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi sumuran dan mikrodilusi. Pengujian antibiofilm dilakukan menggunakan pewarnaan kristal violet. Pengujian antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH.

3.3.1.1 Uji Antibakteri Ekstrak *Spirulina platensis* dan *Cinnamon Essential Oil* (CEO)

3.3.1.1.1 Metode Difusi Sumuran Agar

Pengujian antibakteri menggunakan metode difusi sumuran (*well diffusion*) berdasarkan metode Subramaniam *et al*. (2020) dan CLSI (2018) dengan modifikasi. Media yang digunakan pada penelitian ini yaitu Luria Bertani (LB) agar dan Brain Heart Infusion (BHI) agar. Sekitar 50 µL suspensi bakteri disebarkan ke pelat agar menggunakan cotton swab steril dan dibiarkan mengering selama 10 menit. Dibuat sumur berdiameter 8 mm pada media agar. Sekitar 100 hingga 200 µL sampel dimasukkan ke setiap sumur. Diameter (mm) zona penghambatan yang dihasilkan diukur setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C kemudian dihitung dengan persamaan (1). Uji difusi sumur agar dilakukan dalam tiga kali pengulangan untuk memperoleh hasil yang lebih akurat.

$$DH = DT - DS \quad \text{.....(1)}$$

Keterangan:

DH: Diameter Hambat (mm)

DT: Diameter Total (mm)

DS: Diameter Sumur (mm)

3.3.1.1.2 Metode Mikrodilusi

Aktivitas antibakteri sampel diuji berdasarkan metode Dong *et al*. (2020) dengan modifikasi. Aktivitas antibakteri dievaluasi melalui nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Jumlah populasi bakteri uji *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Escherichia coli* yang digunakan yaitu 10^6cfu/mL. Sebanyak 100 µL media Luria Bertani (LB) atau Brain Heart Infusion (BHI) steril dimasukan ke dalam microplate well no 1-12. Kemudian larutan sampel ditambahkan sebanyak 100 µL ke dalam well no 12, dihomogenkan dengan menaik turunkan larutan pada tip mikropipet. Kemudian dari well no 12 diambil sebanyak 100 µL dimasukan ke dalam well no 11, demikian seterusnya sampai dengan well no 4. Ditambahkan kontrol antibiotik sebanyak 100 µL ke dalam well no 3. Kemudian dimasukan 10 µL suspensi bakteri uji ke dalam well no 2 sampai no 12, dimana well no 1 sebagai kontrol media dan well no 2 sebagai kontrol tumbuh bakteri. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37^{o}C. Diamati kekeruhan yang terjadi pada tiap well dan diperoleh nilai MIC. Setelah itu nilai MBC diperoleh dengan dilakukan penggoresan campuran pada tiap well dalam microplate ke dalam media agar. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37^{o}C. Diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri. Nilai MBC diperoleh jika tidak ada pertumbuhan bakteri. Pengujian dilakukan sebanyak triplo. Nilai MIC juga diukur menggunakan instrument microplate reader. Campuran pada microplate diukur pada OD 600 nm. Blanko terdiri dari media. Jika nilai OD 600 nm masing-masing well lebih besar dari OD 600 nm blanko berarti masih terjadi pertumbuhan bakteri namun bila nilai OD 600 mendekati nilai blanko berarti pertumbuhan bakteri dihambat.

3.3.1.2 Uji Pengambatan Biofilm Ekstrak *Spirulina platensis* dan *Cinnamon Essential Oil* (CEO)

Uji penghambatan biofilm dilakukan berdasarkan Sood *et al*. (2020) dengan modifikasi. Digunakan campuran hasil uji mikrodilusi. Campuran dibuang, kemudian microplate dicuci dengan PBS pH 7. Microplate diwarnai

menggunakan 200 µL kristal violet 1%, diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang, pewarna dibuang, microplate dicuci dengan air bersih dan dikeringkan. Setelah kering, sebanyak 200 µL etanol 96% dimasukkan ke dalam microplate dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Absorbansi diukur menggunakan microplate reader pada 595 nm. Pengujian dilakukan triplo dan persentase penghambatan biofilm dihitung menggunakan persamaan (1) berikut:

$$\%\text{Penghambatan biofilm} = \frac{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi perlakuan}}{\text{Absorbansi kontrol negatif}} \text{ x } 100 \ldots.(2)$$

3.3.1.3 Uji Antioksidan Ekstrak *Spirulina platensis* dan *Cinnamon Essential Oil* (CEO)

Aktivitas diuji berdasarkan Hussen dan Endalew (2023) dengan modifikasi. Larutan 0,1 mM DPPH disiapkan dengan melarutkan 10 g DPPH kristal dalam 100 mL metanol grade analitik untuk membuat 100 ppm DPPH kemudian diencerkan menjadi 30 ppm dan disimpan pada suhu 4°C pada wadah gelap jika tidak segera digunakan. Sebanyak 4 mg sampel uji dilarutkan dalam 10 mL metanol untuk menyiapkan larutan stok 400 µg/mL, kemudian dilakukan pengenceran dengan metanol untuk menyiapkan larutan konsentrat yang dibutuhkan (12,5; 25; 50; 100 dan 200 µg/mL untuk *S. platensis* dan 10, 20, 40, 80, 160 µg/mL untuk CEO). Sebanyak 2 mL larutan sampel dari masing-masing konsentrasi diambil dalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan 3 mL larutan DPPH ke dalam setiap tabung reaksi. Setelah inkubasi selama 30 menit dalam gelap, absorbansi pada panjang gelombang 517 nm direkam menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Metanol digunakan sebagai blanko. Semua penentuan dilakukan dalam tiga ulangan. Persentase inhibisi dihitung berdasarkan persamaan 3, setelah diketahui persen inhibisi kemudian dicari IC50.

$$\%\text{inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \text{ x } 100 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(3)$$

3.3.2 Formulasi Gel Luka dan Uji Stabilitas Gel

3.3.2.1 Formulasi Gel Luka

Formulasi dan persiapan gel dilakukan berdasarkan metode Jurca *et al*. (2020) dengan modifikasi. Gliserol dan akuades dihomogenisasi dan diaduk pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit Synthalen K diiringi dengan pengadukan. Campuran didiamkan untuk proses hidrasi Synthalen K selama 2 jam. Trietanolamin kemudian ditambahkan ke dalam campuran dan diaduk sampai terbentuk gel jernih. Bahan aktif (*Cinnamon Essential Oil* dan ekstrak *Spirulina platensis*) kemudian disuspensikan ke dalam gel. Tabel 3.1 menunjukkan komposisi yang ditambahkan ke dalam Gel

Tabel 3. 1 komposisi gel formulasi

Variabel Gel	**GS (Gel *Spirulina platensis*) (g)**	**GC (Gel Cinnamon Oil/CEO) (g)**	**GCS (Gel Kombinasi) (g)**
Gliserol	10	10	10
Akuades	84,9	87,34	83,34
Synthalen K	0,50	0,50	0,50
Trietanolamin (TEA	0,60	0,60	0,60
Ekstrak *Spirulina platensis*	4	-	4
CEO	-	1,56	1,56

3.3.2.2 Uji Stabilitas Gel Luka

3.3.2.2.1 Uji pH pada Kondisi Penyimpanan

Uji pH sediaan gel luka dilakukan berdasarkan Maru dan Lahoti (2019) dengan modifikasi. Gel uji diambil sebanyak 1 g dimasukan kedalam beaker glass kecil lalu dilarutkan menggunakan air suling sebanyak 50 mL, selanjutnya pH meter yang dikalibrasi terlebih dahulu dengan larutan buffer pH 4 dan pH 7, setelah dikalibrasi lalu dicelupkan kedalam beaker glass berisi sampel uji. Angka pada alat pH meter yang muncul merupakan pH dari sediaan gel tersebut. Berdasarkan SNI

2016-4399-1996 pH sediaan topikal sebaiknya sama dengan pH kulit yaitu 4 hingga 7. pH dianalisis menggunakan pH meter setiap satu minggu sekali selama satu bulan penyimpanan.

3.3.2.2.2 Uji Homogenitas pada Kondisi Penyimpanan

Uji homogenitas sediaan gel luka dilakukan berdasarkan Maru dan Lahoti (2019) dengan modifikasi. Semua gel yang telah dikembangkan diuji untuk homogenitas melalui pemeriksaan visual. Pengujian homogenitas sediaan gel dilakukan dengan cara mengamati pada botol kaca adanya perubahan fasa atau dengan cara mengoleskan gel pada kaca objek dan ditutupi dengan kaca objek yg lain. Gel yang homogen ditandai dengan tidak terdapatnya pemisahan fasa dan gumpalan pada hasil pengolesan dan struktur yang rata. Uji homogenitas dilakukan setiap satu minggu selama satu bulan penyimpanan.

3.3.2.2.3 Uji Daya Sebar pada Kondisi Penyimpanan

Sebanyak 0,5 gram gel jadi diletakkan diatas permukaan kaca datar lalu dihimpit dengan permukaan kaca lainnya. Diameter dayar sebar diukur, kemudian ditambahkan beban mulai dari 50 g, 100 g, 200 g, hingga 250 g diatas permukaan kaca masing-masing beban dibiarkan selama 1 menit. Diukur kembali diamater konstan yang dihasilkan. Berdasarkan SNI 2016-4399-1996 pH sediaan topikal sebaiknya memiliki daya sebar 5 hingga 7 cm.

3.3.2.2.4 *Cycling Test (Freeze-Thaw Cycle)*

Uji stabilitas gel dilakukan dengan metode *cycling test (freeze-thaw test)* yang dilakukan berdasarkan Syarifah *et al*. (2021). Pengujian dilakukan dalam waktu 12 hari dengan enam siklus. Sampel gel disimpan pada suhu 4^{o}C selama 24 jam, lalu dipindahkan ke suhu ruang pada suhu 25^{o}C selama 24 jam (satu siklus). Siklus ini diulang sampai enam kali. Setiap satu siklus dilakukan analisis pengamatan pH, homogenitas, dan daya sebar.

3.3.3 Uji Aktivitas Formula Gel

3.3.3.1 Uji Antibakteri Formula Gel

Uji aktivitas antibakteri sediaan gel dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran dengan media LB agar dan BHI agar yang telah ditambahkan bakteri didalamnya, dan dibuat lubang sumuran dengan diameter 0,8 cm pada layer atas media. Masing-masing sampel gel dimasukkan ke dalam sumuran pada setiap cawan petri. Pengamatan dilakukan dengan pengukuran lebar daerah hambat (LDH) pada cawan petri yang dihasilkan menggunakan persamaan (1).

$$DH = DT - DS \quad \text{.....(1)}$$

Keterangan:

DH: Diameter Hambat (mm)

DT: Diameter Total (mm)

DS: Diameter Sumur (mm)

3.3.3.2 Uji Antioksidan Formula Gel

Aktivitas diuji berdasarkan Imamovic (2021) dengan modifikasi. Larutan 0,1 mM DPPH disiapkan dengan melarutkan 10 g DPPH kristal dalam 100 mL metanol grade analitik untuk membuat 100 ppm DPPH kemudian diencerkan menjadi 30 ppm dan disimpan pada suhu 4°C pada wadah gelap jika tidak segera digunakan. Sebanyak 0,5 gram masing-masing sampel gel dilarutkan dalam 10 mL metanol, Sebanyak 2 mL larutan sampel dimasukan ke dalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan 3 mL larutan DPPH ke dalam setiap tabung reaksi. Setelah inkubasi selama 30 menit dalam gelap, absorbansi pada panjang gelombang 517 nm direkam menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Metanol digunakan sebagai blanko. Semua penentuan dilakukan dalam tiga ulangan. Persentase inhibisi dihitung berdasarkan persamaan 3.

$$\%\text{inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \text{ x } 100 \quad \text{.....(3)}$$