

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini terdiri dari tahap sintesis, karakterisasi, dan pengujian kinerja. Untuk tahap preparasi, sintesis, dan karakterisasi dilaksanakan di laboratorium riset kimia dan laboratorium instrumentasi kimia, Departemen Pendidikan Kimia, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia. Sedangkan tahap karakterisasi SEM-EDX dan XRD menggunakan fasilitas di institusi lain (BRIN Pusat Teknologi bersih dan nanoteknologi). Selanjutnya, pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di laboratorium riset biokimia Universitas Negeri Malang (UM) dan di lab riset gedung FPMIPA B. Waktu penelitian dimulai dari bulan Februari 2022 sampai Agustus 2022.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

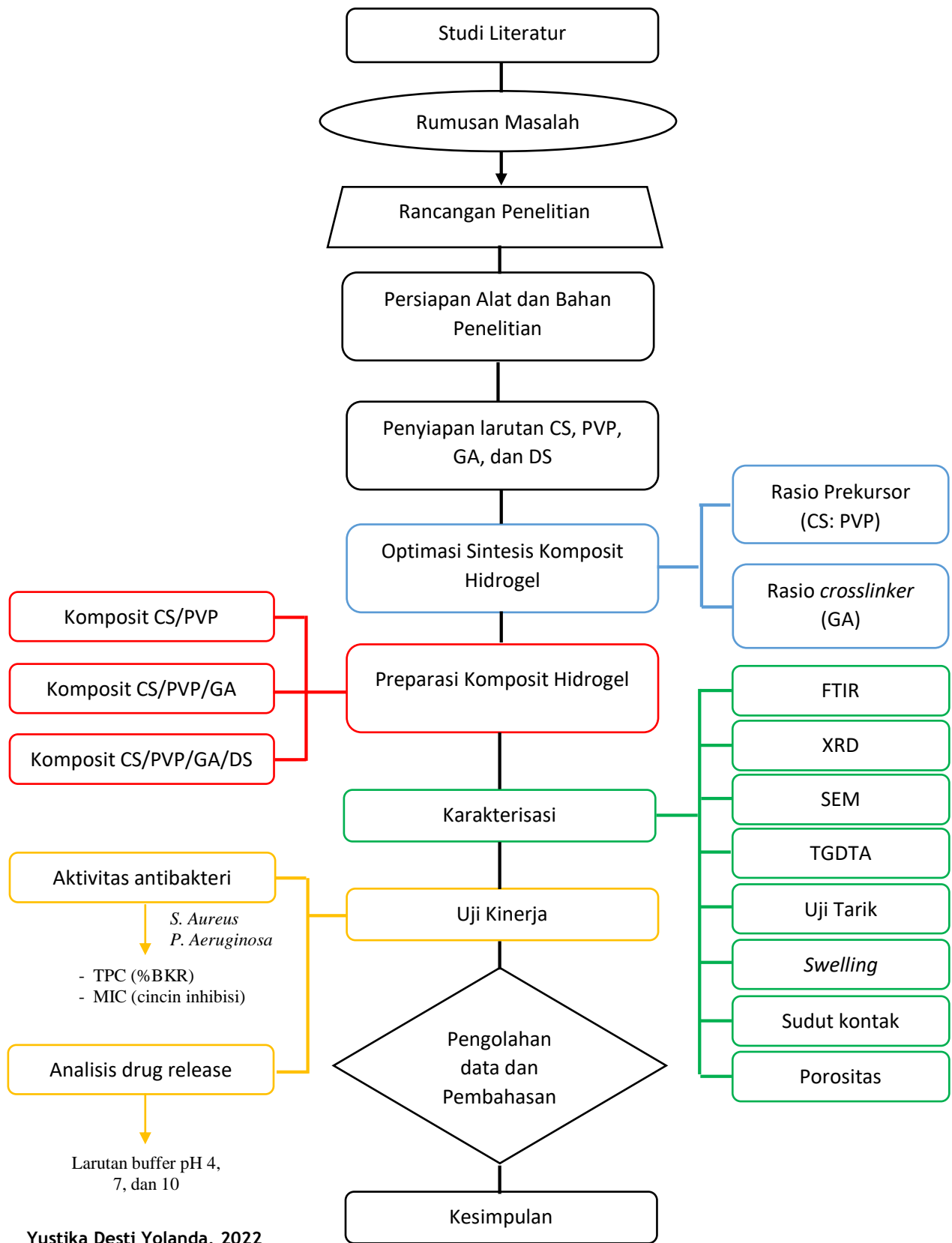
Alat-alat yang digunakan pada tahap sintesis berupa gelas kimia, gelas ukur, batang pengaduk, spatula, pengaduk magnetik, botol semprot, kaca arloji, cawan petri, pipet tetes, neraca analitik, desikator, dan *hot plate*. Sementara karakterisasi hidrogel digunakan beberapa instrumentasi seperti *Fourier Transmission Infra-Red* (FT-IR) Shimadzu DTG 60H untuk metode KBr dan seri Nicolet iS5 untuk metode ATR, *X-Ray Diffraction* (XRD) D8 *Advance Bruker*, *Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray* (SEM-EDX) Phenom Pure G6 dengan detector mix dan SEM-EDX Jeol/JMS IT200 LV dengan detektor *secondary electron*, *Thermogravimetric analysis* (TG/DTA), set alat *sessil drop* (tripod, kamera, *water pass*), set alat porositas dan swelling (wadah plastik dan neraca analitik), set alat *drug release* (hot plate, mikropipet, dan spektrometer UV-Vis), dan uji aktivitas antibakteri (cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu erlenmeyer, mikropipet, spirtus, oven, dan vortex).

Bahan yang digunakan adalah kitosan (CS), Poli(vinilpirolidon) (PVP), glutaraldehid (GA), natrium diklofenak (DS), akuades, larutan buffer, asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), Kloramfenikol, dan strain bakteri *Staphulococcus aureus* dan *Pseudemonas aeruginosa*. Semua bahan selain akuades dan *strain* bakteri memiliki *grade pro-analysis* (PA).

### **3.3 Tahap Penelitian**

Pada tahap sintesis dilakukan preparasi prekursor hidrogel dan optimasi kondisi sintesis sistem komposit hidrogel CS/PVP/GA/DS dengan menggunakan metode kimia. Karakterisasi sistem komposit hidrogel dilakukan dengan menggunakan instrumen FTIR, XRD, SEM/EDX, DTG/DTA, *swelling ratio*, porositas, dan sudut kontak.

Adapun pengujian kinerja komposit hidrogel dilakukan melalui uji aktivitas antibakteri dan penghantaran obat secara *in-vitro*. Bagan alir penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Yustika Desti Yolanda, 2022  
**PENGEMBANGAN MATERIAL DRUG DELIVERY ANTIINFLAMASI BERBASIS HIDROGEL KOMPOSIT KITOSAN/PO**  
 Un  
**Gambar 3.1** Bagan alir penelitian

### 3.4 Optimasi Sintesis Hidrogel Komposit

#### 3.4.1 Preparasi larutan prekursor

1. Preparasi larutan kitosan 1% (w/v)

Kitosan dengan massa tertentu dilarutkan dalam larutan asam asetat 1% (v/v) seperti di Lampiran 1. Kemudian, diaduk menggunakan pengaduk magnetik hingga kitosan larut sempurna dalam larutan asam asetat yang ditandai dengan tidak terdapatnya gumpalan dalam larutan.

2. Preparasi larutan PVP 4% (w/v)

PVP dengan massa tertentu dilarutkan dalam akuades. Kemudian, diaduk menggunakan pengaduk magnetik hingga PVP larut sempurna dalam akuades yang ditandai dengan tidak terdapatnya gumpalan dalam larutan.

3. Preparasi larutan Glutaraldehid 0,001M

Larutan glutaraldehid 25% pada volume tertentu dilarutkan dalam akuades hingga mencapai konsentrasi 0,001M. Kemudian, diaduk menggunakan pengaduk magnetik hingga glutaraldehid larut sempurna dalam akuades yang ditandai dengan homogenya sistem larutan seperti di Lampiran 2.

#### 3.4.2 Optimasi parameter rasio prekursor CS/PVP

Tahap optimasi dilakukan pada parameter variasi rasio komposisi prekursor CS/PVP dengan total volume campuran dan ukuran cetakan dijaga tetap (Tabel 3.1). Adapun pembuatan hidrogel komposit dilakukan melalui metode *solution mixing* dimana larutan kitosan dan larutan PVP yang telah dipreparasi kemudian dicampurkan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang. Campuran kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan dikeringkan dalam suhu ruang hingga terbentuk hidrogel. Setelah itu, hidrogel dilepaskan dari cawan petri dan disimpan di dalam desikator untuk menghindari penyerapan air.

**Tabel 3.1** Komposisi rasio CS/PVP pada hidrogel

Kode Sampel	Volume ratio CS/PVP (total volume 36 ml)	
	CS	PVP
H1	22	8
H2	18	12
H3	15	15
H4	12	18
H5	8	22

### 3.4.3 Optimasi parameter rasio glutaraldehid

Setelah diperoleh kondisi optimum untuk rasio prekursor CS/PVP, selanjutnya dilakukan variasi rasio *crosslinker* pada sistem hidrogel dengan total volume campuran dijaga tetap (Tabel 3.2). Pembuatan hidrogel komposit CS/ PVP/GA dilakukan melalui metode *solution-casting* dimana larutan kitosan dan larutan PVP yang telah dipreparasi dicampurkan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang. Larutan glutaraldehid sebagai agen *crosslinker* ditambahkan ke dalam larutan campuran CS/ PVP dengan variasi rasio, kemudian campuran CS/ PVP/ GA diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang. Larutan campuran kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan dikeringkan dalam suhu ruang hingga terbentuk hidrogel. Setelah itu, hidrogel dilepaskan dari cawan petri dan disimpan dalam desikator untuk menghindari penyerapan air.

**Tabel 3.2** Variasi rasio glutaraldehid pada hidrogel

Kode Sampel	Volume ratio CS/PVP/GA (total volume 36 ml)		
	CS	PVP	GA
HGA1	15	15	0,5
HGA2	15	15	1
HGA3	15	15	1,5
HGA4	15	15	2

HGA5	15	15	2,5
------	----	----	-----

### 3.5 Sintesis hidrogel komposit CS/ PVP/ GA/ DS

Natrium diklofenak (DS) digunakan sebagai jenis obat yang akan ditambahkan pada sistem hidrogel. Saat larutan kitosan dan larutan PVP dicampurkan pada kondisi rasio optimum, kemudian ditambahkan obat dengan variasi massa (Tabel 3.3) ke dalam campuran tersebut sambil diaduk selama 1 jam pada suhu ruang. Larutan glutaraldehid kemudian ditambahkan ke dalam larutan campuran CS/ PVP/ DS dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang. Larutan campuran CS/PVP/GA/DS dituangkan ke dalam cawan petri dan dikeringkan pada suhu ruang. Setelah hidrogel kering sempurna, maka hidrogel dilepaskan dari cawan petri dan disimpan dalam desikator untuk menghindari penyerapan air.

**Tabel 3.3** Variasi massa obat (DS) pada hidrogel

Ratio volume CS/PVP/GA/DS (total volume 36 ml)			
CS	PVP	GA	DS
15	15	1,5	50 mg
15	15	1,5	100 mg
15	15	1,5	150 mg

### 3.6 Karakterisasi Hidrogel Komposit

Pada tahap ini, dilakukan karakterisasi terhadap hidrogel berbasis kitosan yang telah berhasil disintesis, diantaranya:

#### 3.6.1 Interaksi kimia

Pengujian dengan menggunakan instrumentasi FTIR bertujuan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi dalam hidrogel komposit yang telah disintesis. Sampel diuji melalui dua metode. Metode KBr dilakukan dengan mencampurkan hidrogel sebesar  $\pm 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$  dan sebuk KBr. Kemudian, sampel diletakkan pada tabung silinder seperti mur untuk dicetak hingga membentuk pelet. Sementara untuk metode ATR, dilakukan dengan cara sampel yang telah disintesis ditempelkan dengan tip dari alat. Spektrum FTIR hidrogel komposit diukur

pada rentang bilangan gelombang  $3500\text{ cm}^{-1}$  -  $500\text{ cm}^{-1}$  dalam kondisi suhu ruang. Pada penelitian ini, FTIR digunakan untuk membandingkan spektra hidrogel komposit pada berbagai variasi komposisi.

### **3.6.2 Morfologi dan *element mapping***

Karakterisasi menggunakan alat *Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive X-Ray* (SEM-EDX) untuk melihat morfologi permukaan dan area *cross section* serta untuk mengetahui unsur penyusun sampel hidrogel. Gambar morfologi diperoleh berdasarkan hasil deteksi elektron yang dihamburkan atau berdasarkan elektron sekunder yang berasal dari permukaan sampel. Analisis SEM-EDX dipreparasi dengan menempelkan potongan hidrogel sebesar  $\pm 0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$  pada karbon tip di sampel *holder*. Sampel terlebih dahulu *dicoating* menggunakan logam Au, yang selanjutnya dianalisis dengan instrumen SEM-EDX. Jenis detektor yang digunakan pada penelitian ini terdapat dua jenis, diantaranya detektor *secondary electron* serta *detector mix* (*secondary electron* dan *backscattered electron*).

### **3.6.3 Kristalinitas**

Karakterisasi instrumentasi *X-Ray Diffraction* dapat mengidentifikasi fasa kristalin dalam material serta struktur kisinya. Tiap puncak yang muncul pada pola XRD mewakili satu bidang kristal yang memiliki orientasi tertentu (Joseph *et al.*, 2018). Analisis XRD dilakukan setelah sampel dimasukkan ke dalam *holder* dengan bantuan kaca preparat untuk memastikan permukaan sampel rata dengan permukaan *holder*. Selanjutnya sampel dianalisis dengan instrumen XRD *D8 Advanced Bruker* dengan detektor *Lynxeye-t* dan sumber radiasi  $\text{Cu K}\alpha$  (1.5406 Anstrom).

### **3.6.4 Thermogravimetric analysis**

Karakterisasi menggunakan instrumentasi TG-DTA dilakukan untuk mengetahui titik dekomposisi hidrogel komposit, serta mengetahui kestabilan hidrogel komposit terhadap suhu. Sampel hidrogel ditempatkan pada wadah sampel, sementara blanko ditempatkan dalam wadah blanko. Perubahan massa diukur selama perubahan temperatur berlangsung. Data yang diperoleh berupa selisih massa sampel dan massa blanko yang akan diplot dalam

bentuk grafik fungsi massa terhadap temperatur. Alat TG-DTA yang digunakan adalah Shimadzu tipe DTG 60H dengan kondisi pengukuran pada suhu 650, *temperature rate* 10/min, *flow rate* 15 mL/min dengan menggunakan gas nitrogen UHP (*Ultra High Purity*). Analisis *Differential Thermogravimetric* (DTG) dilukan untuk mengetahui setiap tahap laju dekomposisi hidrogel terhadap perubahan suhu. Grafik DTG diperoleh dengan menggunakan aplikasi Origin.

### 3.6.5 Swelling

Analisis *swelling* dilakukan pada variasi media yaitu dalam akuades. Dalam penentuan sifat *swelling* dilakukan penimbangan hidrogel awal (kering), kemudian hidrogel direndam dalam media tersebut pada interval waktu tertentu. Setelah itu, hidrogel dipisahkan dari media dan ditiriskan/didiamkan kemudian ditimbang hidrogel yang telah mengalami *swelling* (*swollen weight*) seperti pada persamaan 3.1. Rasio *swelling* diperoleh dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Swelling (g/g)} = \frac{W_s - W_d}{W_d}, \dots (3.1)$$

dimana  $W_d$  adalah berat hidrogel kering dan  $W_s$  berat *swollen* hidrogel (Rasool *et al.*, 2019).

### 3.6.6 Hidrofilisitas (Sudut kontak/*contact angle*)

Pengukuran *contact angle* bertujuan untuk menentukan hidrofilisitas permukaan hidrogel. Perhitungan *contact angle* permukaan hidrogel dilakukan menggunakan metode *sessile drop* dan dievaluasi dengan aplikasi *Java Software ImageJ*. Sebelum pengukuran dilakukan, hidrogel kering terlebih dahulu disimpan di dalam desikator selama 24 jam untuk memastikan tidak ada molekul air pada hidrogel. Setelah itu 20  $\mu\text{L}$  akuabides diteteskan di atas permukaan hidrogel yang datar menggunakan *microsyringe*, kemudian *contact angle* yang diperoleh dievaluasi. Pengukuran *contact angle* dilakukan di 5 titik yang berbeda pada setiap sampel untuk meminimalisasi *experimental error* dan memperoleh nilai rata-rata. Hasil uji hidrogel komposit pada variasi rasio komposisi dibandingkan (Gull *et al.*, 2020).



### 3.6.7 Porositas Hidrogel

Analisis Porositas dilakukan pada sampel yang telah diukur volume nya (pengukuran dilakukan dengan menggunakan jangka sorong). Sampel ditimbang sebagai massa awal, kemudian direndalm dalam pelarut etanol selama 24 jam dan dihitung massa sampel akhir setelah proses perendaman. Nilai porositas (%) dapat dihitung berdasarkan persamaan 3.2 berikut:

$$\text{Porosity (\%)} = \frac{M_2 - M_1}{\rho V}, \dots (3.2)$$

dimana M1 dan M2 adalah massa sampel sebelum dan setelah perendalam dalam etanol, V adalah volume dari hidrogel, dan  $\rho$  adalah densitas dari etanol (Gull *et al.*, 2020).

## 3.7 Uji Performance Hidrogel Komposit

### 3.7.1 Uji aktivitas *drug release*

Pengujian aktivitas *drug release* dilakukan pada sampel hidrogel yang mengandung Natrium Diklofenak. Hidrogel yang diketahui mengandung obat DS dengan variasi massa obat (50 mg, 100 mg, dan 150 mg) disimpan dalam 1000 mL media buffer pada variasi pH (4, 7, dan 10). Pada setiap interval waktu 20 menit, media buffer dilakukan pengujian absorbansi pada panjang gelombang 269 nm untuk mengetahui presentase *drug release*. Pengulangan uji absorbansi dilakukan hingga serapan bernilai konstan.

Pengujian panjang gelombang maksimum DS pada masing-masing media pun dilakukan untuk membuktikan bahwa ada pengaruh media terhadap sifat spektroskopis dari larutan DS dengan cara *scanning wavelength* dalam rentang panjang gelombang 200 nm – 600 nm, kemudia di *re-plot* grafik yang ditampilkan oleh alat UV-Vis menggunakan aplikasi Origin dengan *tools digitized image*.

### 3.7.2 Uji aktivitas antibakteri

Pengujian antibakteri umumnya dilakukan dengan 2 jenis bakteri yaitu bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Perbedaan kedua jenis bakteri tersebut dapat menghasilkan respon yang berbeda terhadap suatu agen anti-bakteri. Bakteri *Staphylococcus aureus* (strain

gram positif) dan *Pseudomonas Aeruginosa* (strain gram negatif) adalah bakteri yang umum digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri dalam area medis karena kedua bakteri tersebut merupakan bakteri patogen yang sering ditemui pada kulit yang terinfeksi (Hülpüsch *et al.*, 2020) (Ferro *et al.*, 2019). Cara membedakan kedua strain bakteri ini dapat dilakukan melalui metode pewarnaan H.C.J. Bakteri yang berwarna biru-keunguan saat diwarnai dengan pewarna kristal violet dan dibilas dengan etanol adalah bakteri gram positif, sedangkan bakteri gram negatif warnanya akan hilang saat dibilas dengan etanol. Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan komposisi dinding sel kedua jenis bakteri (Tripathi & Sapra, 2021).

#### **a. Metode Kirby Bauer**

Hidrogel komposit kering dibentuk cakram 6 mm kemudian disterilisasi dibawah sinar UV selama 30 menit. Bakteri *P. Aeruginosa* dan *S. aureus* muda masing-masing diinokulasi pada media tumbuh NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi kemudian diencerkan dalam akuades steril hingga konsentrasi  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml, dengan cara dibandingkan turbiditasnya dengan larutan Mc. Farland 0,5 *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-VIS (625 nm). Pada cawan petri steril dituangkan agar NA dan didiamkan hingga memadat. Permukaan agar kemudian dioleskan suspensi bakteri yang telah diencerkan menggunakan *cotton swab* steril mengikuti metode penggoresan Lawn (*Lawn streak method*). Cakram hidrogel komposit diletakan diatas agar yang telah dioleskan bakteri. Cakram kertas saring steril dicelupkan pada akuades steril dan diletakkan diatas agar sebagai kontrol negatif. Sebagai kontrol positif cakram kertas saring steril dicelupkan pada antibiotik standar kloramfenikol. Seluruh tahap tersebut dilakukan secara aseptik dalam laminar. Cawan petri berisi agar, bakteri, dan hidrogel komposit kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam dalam keadaan agar menghadap ke bawah. Setelah inkubasi 24 jam, diobservasi cincin inhibisi yang terbentuk disekitar hidrogel. Cincin inhibisi diukur diameternya, dan dibandingkan dengan masing-masing sampel.

#### **b. Total Plate Counting (TPC)**

Hidrogel komposit dibuat bulat dengan diameter 0,6 mm. Hidrogel diletakan dalam tabung reaksi steril, kemudian ditambahkan 1 mL suspensi bakteri 0,5 OD (*P. aeruginosa*

dan *S. Aureus*). Didiamkan selama 30 menit agar bakteri bereaksi dengan sampel. Kemudian ditambahkan larutan NB sebanyak 10 mL, kemudian isi tabung dihomogenkan dengan *vortex*. Dari tabung berisi Hidrogel dipipet 1 mL larutan kedalam tabung reaksi lain yang berisi 9 mL PBS. Tabung kedua di *vortex* lalu dipipet lagi 1 ml dari tabung kedua kedalam tabung ketiga, dan dari tabung ketiga dipipet 1 ml ke tabung ke empat yang masing-masing berisi 9 ml NB. Dari tabung pertama hingga tabung ke-lima dipipet 1 mL larutan kedalam cawan petri steril. Kedalam cawan petri dituang NA dan diaduk perlahan pada kondisi hangat kuku. Agar berisi bakteri didiamkan hingga mengeras. Cawan berisi agar dan bakteri diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam koloni bakteri yang terbentuk pada agar dihitung. Setiap tahapan prosedur tersebut dilakukan secara aseptik. (Khoerunnisa *et al.*, 2020).