

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan desain model penelitian eksperimen menggunakan metode difusi disk.

#### **B. Subjek dan Objek Penelitian**

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan *mouthwash* ekstrak daun sintrong. Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans*.

#### **C. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2022 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur,

#### **D. Definisi Operasional**

Variable yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Variable bebas: Sediaan formulasi *mouthwash* dari ekstrak daun sintrong yang dibuat dengan 7 konsentrasi berbeda yaitu 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, dan 100%.
2. Variable terikat: Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu konsentrasi terkecil dari ekstrak yang dapat menghambat bakteri.
3. Variable terkendali:
  - a. Waktu dan suhu inkubasi untuk mengontrol pertumbuhan bakteri agar maksimal diperlukan waktu inkubasi maksimum 24 jam dengan suhu 37°C.
  - b. pH media yang paling sesuai untuk kebanyakan media kultur untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel-sel tanaman antara 5,6-5,8.
  - c. Kontaminasi mikroorganisme lain dapat menyebabkan kegagalan dalam pengujian.

- d. Ketebalan media dapat berpengaruh terhadap pengukuran diameter zona hambat sehingga ketebalan media harus sama antara satu dengan lainnya.
- e. Pengaturan jarak cakram yang tepat sangat penting dilakukan untuk mencegah terjadinya tumpang tindihnya zona hambat.

## **E. Instrument Penelitian**

### **1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : tabung reaksi, Bunsen, jarum ose, *cotton swab*, cawan petri, rak tabung, Erlenmeyer, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), pinset, pipet mikro, tisu, timbangan analitik, blender, ayakan, wadah maserasi (toples), batang pengaduk, corong, kertas saring, *rotary evaporator*, *beaker glass*, *hot plate*, pH meter.

### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : Daun Sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) asal Kaubun, Kutai Timur, Kalimantan Timur, pelarut etanol 96%, biakan bakteri *Streptococcus mutans*, *Nutrient Agar* (NA), aquadest, sorbitol, gliserin, menthol, natrium benzoate, asam sitrat dan *peppermint oil*.

## **F. Metode Pengumpulan Data**

### **1. Pengambilan Sampel**

Sampel daun sintrong diperoleh dari Kecamatan Kaubun, Kutai Timur. Populasi mikroba uji diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi.

Daun sintrong dipisahkan dari unsur non esensial seperti batang dan tangkai daun. Daun yang dikumpulkan adalah yang masih utuh, bagus, dan tidak ada bagian yang membusuk. Daun kemudian dibersihkan di bawah air mengalir. Setelah dicuci, ditempatkan di wadah tampah dan dibiarkan hingga air bekas cucian mengering.

## 2. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sintrong

- Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- Ditimbang serbuk kering daun sintrong hijau sebanyak 500 g kemudian dimasukkan kedalam toples kaca
- Ditambahkan etanol 96% 75 bagian dari serbuk kering daun sintrong
- Ditutup toples yang diberi aluminium foil
- Dilakukan ekstraksi secara maserasi selama 3 hari, pada suhu kamar dan terhindar dari cahaya, dengan pengadukan secara berkala
- Saring ekstrak daun sintrong dan pisahkan dengan ampasnya
- Dilakukan remaserasi selama 3 hari, disaring menggunakan kertas saring dan pisahkan ampas menggunakan kain flanel
- Kemudian di uapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak kental (Simanungkalit *et al.*, 2020)

## 3. Pembuatan Formulasi Sediaan *Mouthwash*

Tabel 1. Formulasi sediaan *mouthwash*

Bahan	Fungsi	Konsentrasi %						
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Ekstrak Daun Sintrong	Zat aktif	0	10	30	50	70	90	100
Sorbitol	Pemanis	4	4	4	4	4	4	4
Gliserin	Humektan	4	4	4	4	4	4	4
Menthol	Penyegar	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Na Benzoat	Pengawet	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Asam sitrat	Dapar	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<i>Peppermint oil</i>	Pemberi aroma	3 tetes	3 tetes	3 tetes	3 tetes	3 tetes	3 tetes	3 tetes
Aquadest ad	Pelarut	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

Keterangan :

F1 : Formulasi tanpa ekstrak etanol daun sintrong (kontrol negatif)

F2 : Mengandung Ekstrak Etanol daun sintrong 10%

F3 : Mengandung Ekstrak Etanol daun sintrong 30%

F4 : Mengandung Ekstrak Etanol daun sintrong 50%

F5 : Mengandung Ekstrak Etanol daun sintrong 70%

F6 : Mengandung Ekstrak Etanol daun sintrong 90%

F7: Mengandung Ekstrak Etanol daun sintrong 100%

#### Cara Pembuatan Formulasi :

- a. Semua bahan ditimbang
- b. Menthol dilarutkan dengan alkohol 70% lalu digerus hingga larut.
- c. Masukkan Natrium Benzoat dan Asam Sitrat lalu ditambahkan sedikit gliserin dan digerus hingga larut.
- d. Ekstrak daun sintrong dilarutkan dengan sedikit gliserin dan dimasukkan ke dalam mortir gerus sampai larut.
- e. Masukkan sorbitol, gerus sampai homogen.
- f. Tambahkan aquadest sedikit demi sedikit sambil digerus.
- g. Selanjutnya, larutan *mouthwash* disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan dalam gelas ukur kemudian ditambahkan aquadest sampai 100 ml.
- h. Dimasukkan larutan ke dalam botol dan ditambahkan *peppermint oil* sebanyak 3 tetes.

#### 4. Pembuatan Media Agar

- a. Sebanyak 2,4 g nutrisi agar ditimbang, dan air suling sebanyak 120 ml.
- b. Dimasukkan NA kedalam erlenmeyer, lalu masukan aquadest .
- c. Dilarutkan NA dan aquadest menggunakan *hot plate* sampai larut homogen.
- d. Tutup erlenmeyer menggunakan aluminium foil dan masukan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Rollando, 2019).

#### 5. Inokulasi Bakteri Pada Media Agar Miring

Sediaan bakteri *Streptococcus mutans* yang diawetkan pada media agar diekstraksi menggunakan jarum ose steril, kemudian digoreskan ke dalam media NA yang dimiringkan. Bakteri yang

digoreskan pada media agar dikultur dalam inkubator selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C (Handayani *et al.*, 2016).

#### **6. Pembuatan Larutan Standar 0,5 McFarland**

Dalam labu erlenmeyer, 9,5 ml larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> digabungkan dengan 0,5 ml larutan BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. Campuran kemudian diaduk sampai terbentuk larutan keruh. Kekeruhan ini berfungsi sebagai acuan kekeruhan suspensi bakteri uji (Handayani *et al.*, 2016).

#### **7. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah dikultur pada agar miring kemudian dikeluarkan dengan kawat ose steril dan disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% (0,18 g dilarutkan dalam 20 ml air) sampai kekeruhannya sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* (Handayani *et al.*, 2016).

#### **8. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi**

Disiapkan 2 cawan petri steril. Dituang media *nutrient agar* sebanyak ± 15 ml ke dalam cawan petri dan biarkan sampai memadat. Kemudian diambil 1 *cotton swab* dan celupkan ke dalam suspensi bakteri. Usapkan pada seluruh permukaan media NA. *Paper disk* disiapkan dan dicelupkan ke dalam larutan *mouthwash* F1, F2, F3, F4, F5, F6 kontrol negatif, dan kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah Klorheksidin 0,2%. Kontrol negatif yang digunakan adalah formulasi *mouthwash* tanpa ekstrak. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Semua cawan ditutup dengan *plastic wrap* dan dimasukkan dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C. Ada tidaknya daerah jernih menunjukkan hasil uji aktivitas antibakteri pada *mouthwash* menggunakan *paper disk*. Zona bersih di sekitar *paper disk* menunjukkan bahwa bakteri uji menghambat pertumbuhan.

### **G. Teknik Analisis Data**

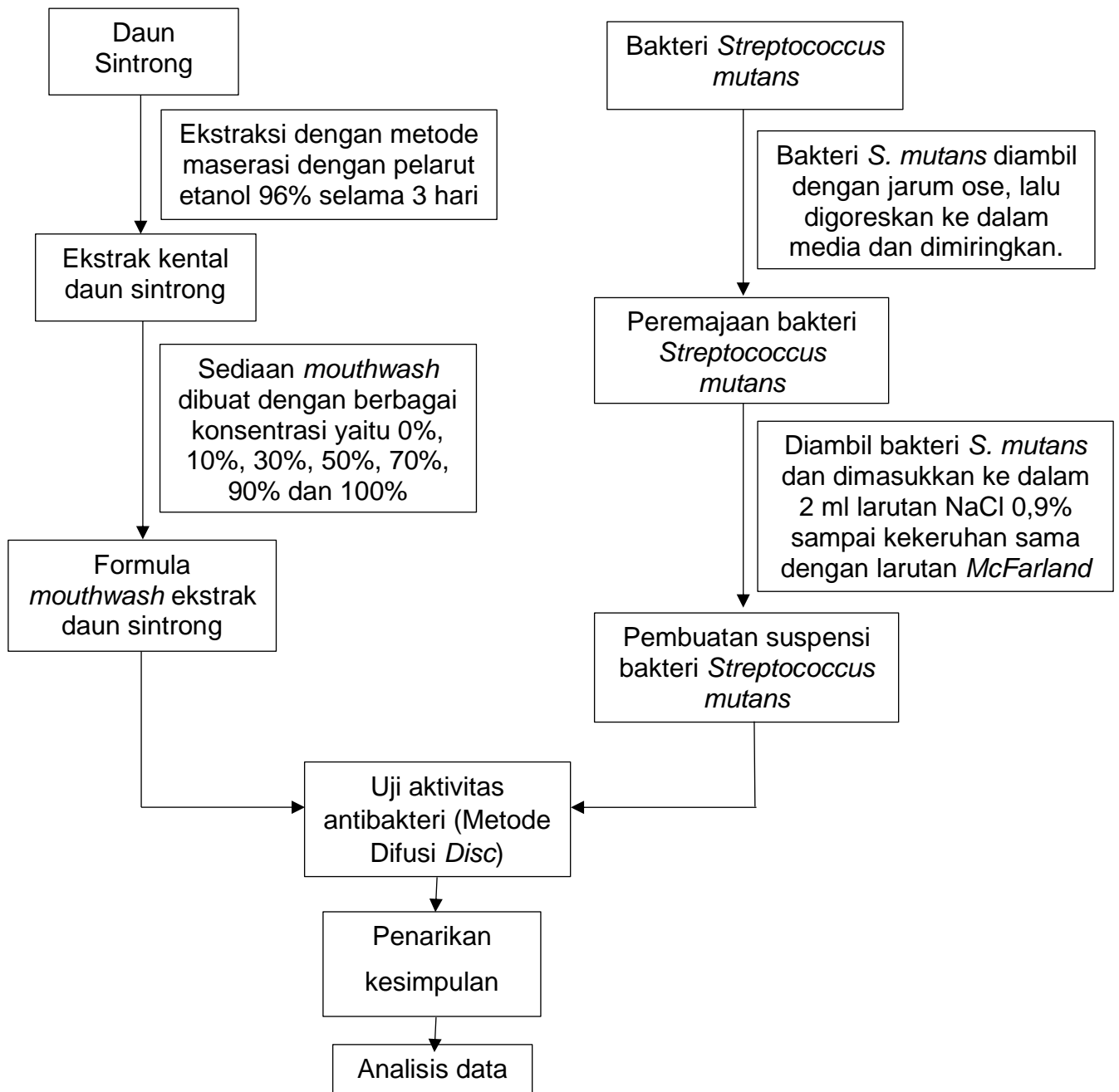
Nilai diameter zona hambat yang telah diperoleh selanjutnya dianalisis dan diolah dengan Microsoft Excel dan Uji *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan *software* SPSS. Sebelum menjalankan uji ANOVA, data diperiksa normalitasnya kemudian homogenitasnya sebagai syarat analisis data. Uji normalitas menentukan apakah data yang diperoleh terdistribusi secara normal. Jika hasilnya secara signifikan lebih besar dari ambang signifikansi ( $= 0,05$ ), normalitas terpenuhi. Jika tingkat signifikansinya lebih kecil dari  $0,05$ , maka data tersebut tidak berdistribusi normal.

Kemudian, uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui varians dari populasi yang berbeda, menunjukkan apakah mereka sama atau tidak. Varians dua atau lebih kelompok populasi data tidak sama jika nilai signifikansi pada uji homogenitas lebih kecil dari taraf signifikansi ( $= 0,05$ ). Jika nilai signifikan lebih besar dari  $0,05$ , varians dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah sama.

### **H. Etika Penelitian**

Penelitian ini mengikuti kaidah sesuai dengan etika penelitian yang telah ditetapkan dan sampel pada penelitian ini tidak menggunakan hewan uji maupun manusia.

## I. Alur Jalannya Penelitian



Gambar 1. Alur Penelitian

## J. Jadwal Penelitian

Tabel 2. Jadwal penelitian

No.	Kegiatan	Bulan											
		Agt	Sep	Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul
1.	Persiapan Proposal												
2.	Seminar Proposal												
3.	Penelitian												
4.	Penyusunan Hasil dan Pembahasan												
5.	Seminar Hasil												