

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Jenis penelitian ini adalah eksperimental adapun langkah-langkah penelitian meliputi penyiapan bahan, identifikasi sampel, pembuatan ekstrak, pembuatan sediaan permen jelly. Kemudian dilaksanakan skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak sediaan Sintrong dan sediaan permen jelly terhadap *Streptococcus mutans* dengan metode difusi disk.

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

##### **1. Subjek**

Subjek dalam penelitian ini yaitu bakteri *Streptococcus mutans*

##### **2. Objek**

Objek dalam penelitian ini yaitu daun Sintrong ( *Crassocephalum crepidioides* )

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

##### **1. Tempat**

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia bahan alam dan Mikrobiologi Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

##### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2021 – juni 2022 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

#### D. Definisi Oprasional:

1. Variable bebas : Sediaan permen jelly dari ekstrak daun Sintrong (*Crassocephalum Crepidiodes*)
2. Variable terikat : Nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum)
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. Untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel tanaman, pH sebagian besar media kultur harus antara 5,6 dan 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. Instrumen Penelitian

##### 1. Alat

Alat-alat yang dipakai pada penelitian ini yaitu blender, ayakan, timbangan analitik, wadah maserasi (toples), batang pengaduk, corong, kertas saring, *rotary evaporator*, *beaker glass*, *hot plate*, termometer, cetakan permen jelly, lemari pendingin, cawan porselen, *autoclave*, kapas, Laminar Air Flow (LAF), bunsen, jarum ose, tabung reaksi, inkubator, cawan petri.

##### 2. Bahan

Bahan yang dipakai ialah daun Sintrong, etanol 70%, aquades, gelatin, asam sitrat, stefia, fruktosa, *Tutti frutti dry flavor*, bakteri *Streptococcus mutans*, media Nutrient Agar (NA)

## **F. Metode Pengumpulan Data**

### **1. Pengumpulan Sampel**

Sampel yang digunakan di penelitian ini yaitu daun sintrong didapat dari daerah kecamatan Loa kulu, kabupaten Kutai Kartanegara.

### **2. Pengolahan Sampel**

Setelah dikumpulkan, daun sintrong dibersihkan kemudian dipisahkan dari tanahnya. Mereka kemudian dicuci di bawah air mengalir dan kemudian diangin-anginkan jauh dari sinar matahari langsung. Sampel disiapkan untuk ekstraksi setelah pengeringan dan pembuatan serbuk.

### **3. Ekstraksi sampel**

Adapun proses ekstraksi daun sintrong adalah sebagai berikut :

- a. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b. Timbang serbuk kering daun Sintrong sebanyak 500g kemudian dimasukkan kedalam wadah
- c. Masukkan etanol 96% 75 bagian dari serbuk kering daun Sintrong
- d. Ditutup wadah (toples kaca) yang ditutup pakai alumunium foil
- e. Dilakukan ekstraksi secara maserasi selama 3 hari, pada suhu kamar dan terhindar dari cahaya, dengan pengadukan secara berkala
- f. Saring ekstrak daun Sintrong dan pisahkan dengan ampasnya
- g. Setelah 3 hari remaserasi, campuran disaring melalui kertas saring dan endapannya dihilangkan dengan kain flanel.
- h. Kemudian di uapkan menggunakan rotary evaporator sampai terbentuk ekstrak kental
- i. Di buat sediaan sebanyak 500 g. Ekstrak etanol daun Sintrong dengan konsentrasi 96%.

#### 4. Formulasi Permen Jelly

- a. Formula permen jelly dilihat dari penelitian (Dhina dkk, 2019).

**Tabel 3. 1. Formulasi Permen jelly**

Bahan	FI	FII	FIII	FIV	FV	FVI	FVII
Ekstrak etanol daun Sintrong (zat aktif)	0%	10%	30%	50%	70%	90%	100%
Gelatin (pembentuk gel)	5	5	5	5	5	5	5
Asam sitrat (pengatur keasaman)	0,15	0,10	0,08	0,06	0,05	0,03	0,02
Fruktosa (pemanis)	15	15	15	13	13	12	10
Stefia (pemanis)	2,2	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Tutti frutti dry flavor (pengatur aroma dan rasa)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Aquadest ad	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml

- b. Pembuatan permen jelly dalam 100gram (agistia dkk, 2015)
- 1) Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
  - 2) Masukkan aquadest, stefia, dan fruktosa kedalam wadah dan aduk sampai larut
  - 3) Tambahkan gelatin secara bertahap sambil diaduk agar bisa larut dan bercampur dengan baik
  - 4) Kemudian, larutan diaduk sampai tercipta masa jelly diatas api kecil dengan suhu 100°C selama 5-10 menit
  - 5) Tambahkan asam sitrat dan tutti frutti dry flavor pada suhu  $\pm 75^{\circ}\text{C}$

- 6) Kemudian ekstrak daun Sintrong ditambahkan kedalam campuran, diaduk hingga mengental pada suhu  $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$  selama 10-15 menit
- 7) Massa yang sudah terbentuk dituangkan kedalam cetakan, dan biarkan 15-30 menit pada suhu ruangan
- 8) Kemudian dimasukkan kedalam lemari pendingin pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$  selama 12 jam
- 9) Permen jelly yang sudah jadi dikeluarkan dari cetakan, masukkan kedalam wadah, dan ditutup rapat

#### **5. Pembuatan media agar**

- a. Timbang media NA sebanyak 2,4 gram dan masukan kedalam erlenmeyer, lalu masukan aquadest sebanyak 100ml
- b. Dilarutkan NA dan aquadest menggunakan hot plate sampai larut homogen
- c. Tutup erlenmeyer menggunakan aluminium oil dan masukan ke dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.

#### **6. Pembuatan agar miring**

Tambahkan 5 ml media NA yang baru diproduksi ke masing-masing dari tiga tabung reaksi steril, lalu bungkus dengan aluminium foil. Setelah 15 menit disterilisasi pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dalam autoklaf, media kemudian dibiarkan dingin hingga suhu kamar dan diposisikan miring hingga mengeras. Untuk menginokulasi bakteri, gunakan media agar miring (peremajaan bakteri).

#### **7. Inokulasi bakteri pada media agar**

Sediaan bakteri *Streptococcus mutans* yang disimpan dalam media agar diekstraksi dengan menggunakan jarum ose steril, kemudian digoreskan ke dalam media untuk dimiringkan. Bakteri yang tergores diinkubasi dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama satu siklus selama 24 jam.

### **8. Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan (Larutan *Mc. Farland*)**

Larutan  $\text{BaCl}_2$  dan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  digabungkan dalam 9,5 ml. Hingga 0,5 ml  $2\text{H}_2\text{O}$  dalam erlenmeyer. Campuran kemudian diaduk sampai terbentuk larutan yang kabur. Kekeruhan suspensi bakteri uji distandarisasi menggunakan kekeruhan ini.

### **9. Pembuatan suspense bakteri uji**

Bakteri uji kemudian dipindahkan melalui loop kawat steril ke dalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% (0,18 g dilarutkan dalam 20 ml air), di mana mereka disuspensikan sampai kekeruhannya sama dengan kekeruhan standar larutan *Mc. Farland*.

### **10. Penentuan aktivitas antibakteri sediaan permen jelly dari ekstrak daun sintrong terhadap bakteri *streptococcus mutans***

- a. Siapkan cawan petri, dituang medium NA sebanyak  $\pm 15$  ml kedalam tabung reaksi.
- b. Dichelupkan ose steril kedalam suspensi bakteri. Lalu bakteri dihomogenkan dengan media agar yang terdapat di tabung reaksi.
- c. Dituangkan ke cawan petri dan didiamkan sampai memadat.
- d. Panas kan alu dan mortar dengan air panas tunggu sampai 3-5 menit lalu buang air dan masukan sediaan permen jelly ke dalam mortar lalu gerus sampai permen jelly mencair.
- e. Kertas cakram (paper disk) yang sudah berdiameter 6 mm disiapkan lalu dicelupkan sediaan permen jelly dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 0% kontrol negatif, dan kontrol positif. kontrol positif menggunakan Chlorhexidine 0,2%
- f. Diletakkan pada cawan steril yang telah terisi media.
- g. Setelah dibungkus plastic wrap semua pelat menjalani fase inkubasi 24 jam dalam inkubator.

- h. Jika terdapat daerah yang terhambat perkembangan bakteri uji yang dibuktikan hasil uji aktivitas antibakteri ketika kertas cakram memiliki zona bening di sekitarnya, ekstrak daun sintrong dapat dilihat dengan ada tidaknya daerah bening tersebut (Desi andriani 2017 )

## **G. Teknis dan Analisis Data**

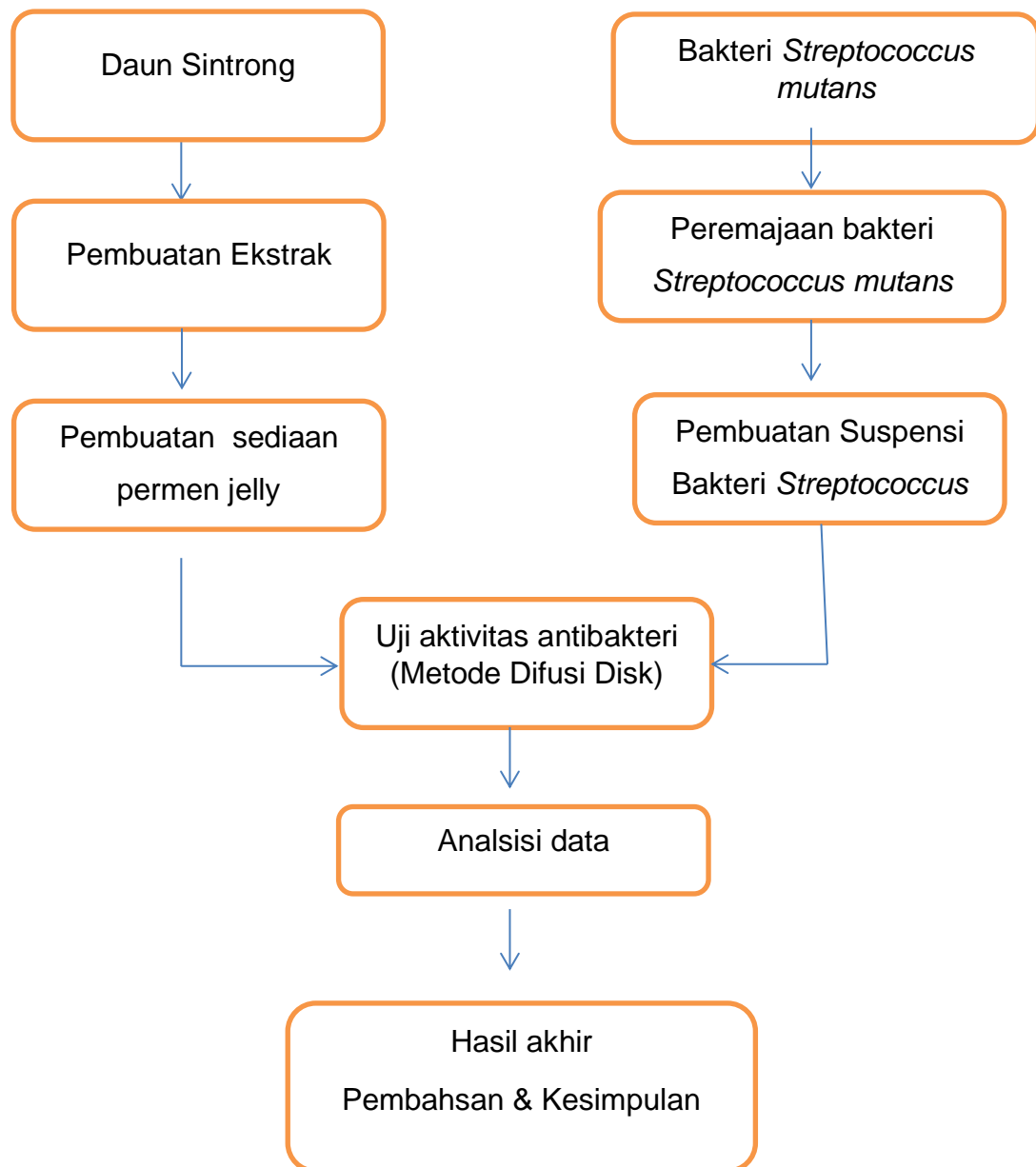
### **1. Analisis Univariat**

Analisis univariat dilaksanakan agar mendapatkan data distribusi dari variabel yang diteliti, yaitu variabel bebas (konsentrasi ekstrak etanol daun Sintrong) dan variabel terikat (daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*) sehingga bisa diketahui karakteristik variabel yang diamati.

### **2. Analisis Bivariat**

Setelah didapatkan data hasil daya hambat bakteri, maka dilakukan uji metode statistik, yakni standar deviasi dan *One Way Anova*. Analisis ini dilakukan agar melihat efek antibakteri pada kelompok perlakuan dengan tingkat kemaknaan ( $p < 0,05$ ). Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk menguji normalitas sebaran data populasi sampel dengan taraf signifikansi kurang dari 0,05.

## H. Alur Jalannya Penelitian





### I. Etika Penelitian

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

### J. Jadwal Penelitian

**Tabel 3. 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												