

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian uji efektivitas antibakteri ekstrak etanol daun sintrong terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dengan metode dilusi adalah jenis penelitian kuantitatif, yaitu eksperimental murni. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur, Samarinda.

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

##### 1. Variabel bebas (*independent*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*).

##### 2. Variabel terikat (*dependent*)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) atau bisa juga disebut MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan nilai KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) atau bisa juga disebut MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*).

##### 3. Variabel terkendali (*control*)

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah kondisi daun yang digunakan, suhu inkubasi, waktu inkubasi, media inkubasi, konsentrasi, pH, kontaminasi, dan kemampuan peneliti dalam melakukan inokulum bakteri pada media.

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

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dalam waktu 2 bulan, dimulai dari bulan Mei 2022 sampai Juni 2022 di laboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur, Samarinda.

#### D. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun sintrong merupakan hasil maserasi serbuk simplisia daun sintrong dengan pelarut etanol 96%.
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi.
3. Sediaan Formulasi *mouthwash* ekstrak daun sintrong dibuat dengan 6 konsentrasi berbeda, yaitu: 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, dan 100%.
4. Metode uji antibakteri dilakukan dengan mendapatkan nilai KHM dan KBM menggunakan metode dilusi. Parameter yang diamati adalah kekeruhan media kultur yang tidak terlihat adanya pertumbuhan bakteri setelah dilakukan inkubasi.
5. KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) adalah konsentrasi terkecil dari ekstrak yang dapat menghambat bakteri.
6. KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) adalah konsentrasi terkecil dari ekstrak yang dapat membunuh bakteri.

#### E. Instrumen Penelitian

##### 1. Alat Penelitian:

Botol semprot, gelas ukur, kapas, kain kasa steril, *aluminium foil*, autoklaf, jarum ose, bunsen, *magnetic stirrer*, LAF (*Laminar Air Flow*), toples kaca, batang pengaduk, kain flanel, blender, pengayak no. 40, *rotary evaporator*, *waterbath*, erlenmeyer, vortex, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spidol, kertas label, cawan petri, inkubator, *hot plate*, pipet mikro, kertas saring, botol, dan pH meter digital.

##### 2. Bahan Penelitian:

500 gram daun sintrong, etanol 70%, etanol 96%, media NA (*Nutrient Agar*), media NB (*Nutrient Broth*), aquadest, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, NaCl, klorheksidin, *menthol*, natrium benzoat, asam sitrat, gliserin, sorbitol, dan *peppermint oil*.

## F. Metode Pengumpulan Data

Dalam penelitian ini teknik pengumpulan data dilakukan dengan metode observasi, yaitu teknik yang dilakukan dengan mengamati objek yang diteliti secara langsung.

Adapun bahan formulasi yang digunakan dalam pembuatan sediaan *mouthwash* ekstrak daun sintrong sebagai berikut:

**Tabel 1. Formulasi Sediaan *Mouthwash* (Fajar et al., 2021)**

Bahan	Fungsi	Konsentrasi % b/b					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ekstrak Daun Sintrong	Zat aktif	10	30	50	70	90	100
<i>Menthol</i>	Penyegar	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Natrium benzoate	Pengawet	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
Gliserin	Humektan	4	4	4	4	4	4
Sorbitol	Pemanis	4	4	4	4	4	4
<i>Peppermint oil (oleum menthae piperitae)</i>	Pemberi aroma	3 tetes	3 tetes	3 tetes	3 tetes	3 tetes	3 tetes
Aquadest	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

### Keterangan:

F1 : Mengandung ekstrak etanol daun sintrong 10%

F2 : Mengandung ekstrak etanol daun sintrong 30%

F3 : Mengandung ekstrak etanol daun sintrong 50%

F4 : Mengandung ekstrak etanol daun sintrong 70%

F5 : Mengandung ekstrak etanol daun sintrong 90%

F6 : Mengandung ekstrak etanol daun sintrong 100%

### 1. Pengumpulan Bahan Daun Sintrong

Daun sintrong didapatkan dari Kecamatan Kaubun, Kutai Timur telah dikumpulkan pada bulan Januari 2022. Sampel daun sintrong yang akan digunakan pada penelitian ini diambil yang berwarna hijau dan dalam keadaan segar. Kemudian dilakukan determinasi tumbuhan oleh ahli botani herbarium di Laboratorium Keologi dan Konservasi Biodiversitas Hutan Tropis, Universitas Mulawarman, Kalimantan Timur.

## 2. Pembuatan Serbuk Daun Sintrong

- a. Diambil bagian daun sintrong dan dipisahkan dari batang dan tangkai daunnya
- b. Kemudian daun sintrong dicuci bersih untuk menghilangkan kotorannya menggunakan air mengalir dan diletakkan di wadah
- c. Selanjutnya dikeringkan dengan diangin-anginkan sampai mengering
- d. Jika daun sintrong yang dikeringkan saat diremas mudah remuk maka pengeringan dihentikan, kemudian diserbuk menggunakan blender agar halus
- e. Selanjutnya diayak serbuk daun dengan pengayak No. 40
- f. Kemudian disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup rapat (Suci *et al.*, 2020).

## 3. Ekstraksi Etanol Daun Sintrong

- a. Disiapkan alat dan bahan yang diperlukan
- b. Ditimbang 500 gram serbuk daun sintrong kering dan dimasukkan ke dalam wadah kaca
- c. Ditambahkan etanol 96% 75 bagian dari serbuk kering daun sintrong
- d. Kemudian toples ditutup dengan *aluminium foil*
- e. Diekstraksi dengan cara maserasi selama 3 hari pada suhu kamar dengan pengadukan secara berkala
- f. Lalu disaring menggunakan kertas saring dan dipisahkan dari ampasnya
- g. Remaserasi selama 3 hari pada suhu kamar dengan pengadukan berkala menggunakan kain flanel
- h. Kemudian diuapkan dengan rotary evaporator dan dikentalkan dengan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental.
- i. Disiapkan 500 gram preparat dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, dan 100% (Suci *et al.*, 2020).

#### 4. Pembuatan Formulasi Sediaan *Mouthwash*

- a. Seluruh bahan ditimbang
- b. Dilarutkan *menthol* dengan etanol 70% lalu dimasukkan ke dalam mortir dan digerus hingga larut
- c. Dimasukkan asam sitrat dan natrium benzoat lalu ditambahkan sedikit gliserin dan digerus hingga larut
- d. Dilarutkan ekstrak daun sintrong dengan sedikit gliserin lalu dimasukkan ke dalam mortir dan digerus hingga larut
- e. Dimasukkan sorbitol lalu digerus hingga homogen
- f. Ditambahkan aquadest sedikit demi sedikit sambil digerus
- g. Kemudian larutan *mouthwash* disaring di gelas ukur menggunakan kertas saring lalu ditambahkan aquadest sampai 100 ml
- h. Dimasukkan ke dalam botol dan ditambahkan *peppermint oil* sebanyak 3 tetes.
- i. Kemudian diukur pH sediaan menggunakan pH meter digital (Fajar *et al.*, 2021).

#### 5. Uji Aktivitas Antibakteri

##### a. Sterilisasi Alat

- 1) Alat-alat yang akan digunakan dibilas dan dikeringkan
- 2) Mulut gelas ukur dan botol semprot ditutup dengan kapas, dibungkus dengan kain kasa steril, kemudian dilapisi dengan *aluminium foil*
- 3) Alat gelas lainnya, seperti tabung reaksi dan cawan petri, dibungkus kertas coklat, sedangkan bagian mulut erlenmeyer yang berisi media dilapisi *aluminium foil*.
- 4) Semua alat disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.
- 5) Kemudian disterilkan jarum ose dengan pemijaran pada bunsen.

- 6) Lalu dibersihkan lemari aseptis dan disemprotkan etanol 70%, sebelum lemari digunakan didiamkan terlebih dahulu selama 15 menit (Suci *et al.*, 2020).

## **b. Pembuatan Media**

### **1) Media NA (*Nutrient Agar*)**

- a) Ditimbang 2,4 gram NA
- b) Selanjutnya NA dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan dicampur dengan 120 ml aquadest
- c) Lalu NA dipanaskan dengan *hot plate* hingga terlarut homogen dan mendidih
- d) Erlenmeyer kemudian ditutup dengan *aluminium foil* dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Mpila *et al.*, 2012).

### **2) Media NB (*Nutrient Broth*)**

- a) Ditimbang 0,8 gram serbuk NB
- b) Selanjutnya NB dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan 100 ml aquadest
- c) Lalu NB dipanaskan dengan *hot plate* sampai larut merata dan mendidih
- d) Erlenmeyer kemudian ditutup dengan *aluminium foil* dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Mpila *et al.*, 2012).

## **c. Pembuatan Medium Agar Miring**

- 1) Media NA (*Nutrient Agar*) dituang sebanyak 5 ml ke dalam 3 tabung reaksi dan ditutup dengan *aluminium foil*
- 2) Media selanjutnya disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C
- 3) Selanjutnya ditempatkan dalam posisi miring pada suhu kamar sampai media mengeras. Media agar miring yang dipadatkan digunakan untuk inokulasi bakteri (Handayani *et al.*, 2016).

#### **d. Peremajaan Bakteri dengan Inokulasi pada Media Agar Miring**

Proses inokulasi dikerjakan secara aseptik dengan LAF (*Laminar Air Flow*).

- 1) Dengan menggunakan jarum ose, inokulasikan 1 ose bakteri *Streptococcus mutans* dengan cara digoreskan pada media dan dimiringkan
- 2) Selanjutnya media yang telah berisi bakteri diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C (Handayani *et al.*, 2016).

#### **e. Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan Mc Farland 0.5**

Victor (1980, dalam Dima *et al.*, 2016, hal 285) menyatakan cara pembuatan standar kekeruhan larutan Mc Farland sebagai berikut:

- 1) Sebanyak 9,95 ml larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dicampur dengan 0,5 ml larutan BaCl<sub>2</sub> 1% dalam labu erlenmeyer
- 2) Campuran tersebut kemudian diaduk hingga terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan suspensi bakteri uji kemudian digunakan sebagai standar pembandingan.

#### **f. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

Victor (1980, dalam Dima *et al.*, 2016, hal 285) menyatakan cara pembuatan suspensi bakteri uji sebagai berikut:

- 1) Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diremajakan pada media agar miring diambil dengan jarum ose
- 2) Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang terdapat 2 ml NaCl 0,9% (0,18 gram dilarutkan dalam 20 ml air) lalu di vortex
- 3) Kemudian diamati kekeruhan pada tabung reaksi dan dibandingkan dengan standar Mc Farland.

### **g. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Dilusi**

Aktivitas antibakteri formulasi *mouthwash* yang mengandung ekstrak etanol daun sintrong diteliti menggunakan metode dilusi. Parameter yang diamati adalah kekeruhan dalam tabung dan temuan akhir yang dicapai dengan pendekatan ini, yaitu nilai KHM dan KBM.

#### **1) Penentuan nilai KHM (Kadar Hambat Minimum)**

- a) Setiap tabung reaksi diisi dengan 2 ml media NB (*Nutrient Broth*). Kemudian larutan uji ditambahkan ke dalam masing-masing tabung secara bertahap sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, dan 100%. Kemudian ditambahkan 1 ml suspensi *Streptococcus mutans* ke dalam masing-masing tabung dan di vortex
- b) Kontrol positif dibuat menggunakan media NB sebanyak 2 ml yang dicampur dengan 1 ml klorheksidin 0,2%, dilanjutkan dengan 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dan selanjutnya di vortex
- c) Kontrol negatif dibuat dengan menggabungkan 2 ml suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dengan 2 ml media NB
- d) Kontrol media dibuat dengan media NB tanpa penambahan suspensi bakteri
- e) Selanjutnya semua uji, kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- f) Selanjutnya dilihat kekeruhan larutan. Konsentrasi terkecil yang tidak mengalami kekeruhan (jernih) dan tidak adanya gumpalan putih direpresentasikan sebagai KHM.

Kekeruhan larutan uji merupakan parameter yang perlu diperhatikan untuk menentukan nilai KHM. Larutan yang terlihat jernih dengan konsentrasi terkecil dinyatakan sebagai KHM (Rollando, 2019).



## 2) Penentuan nilai KBM (Kadar Bunuh Minimum)

- a) Dilakukan dengan pengamatan pada media padat. Disiapkan cawan petri dengan beberapa konsentrasi larutan uji yang digunakan pada penentuan nilai KHM sebelumnya (larutan yang digunakan adalah larutan bening yang tidak mengalami kekeruhan)
- b) Setiap cawan petri kemudian diisi dengan  $\pm 15$  ml media NA dan dibiarkan mengeras.
- c) Setelah itu, satu ose larutan uji yang digunakan dalam uji nilai KHM (dari tabung larutan 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, atau 100%) digoreskan ke dalam media NA yang telah disiapkan di atas cawan petri
- d) Diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.
- e) Konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri pada media agar dinyatakan sebagai KBM.

Ada tidaknya pertumbuhan bakteri yang dibuktikan dengan munculnya bercak putih atau koloni bakteri pada media agar merupakan parameter uji KBM (Rollando, 2019).

### h. Pengolahan Data Hasil Uji dan Pengukuran

Kemudian hasil uji dan pengukuran, akan dianalisis secara deskriptif dalam bentuk tabel hasil penelitian agar terlihat apakah hasil yang didapatkan telah sesuai dengan penelitian yang dilakukan dan memastikan data telah relevan.

## G. Teknik Analisis Data

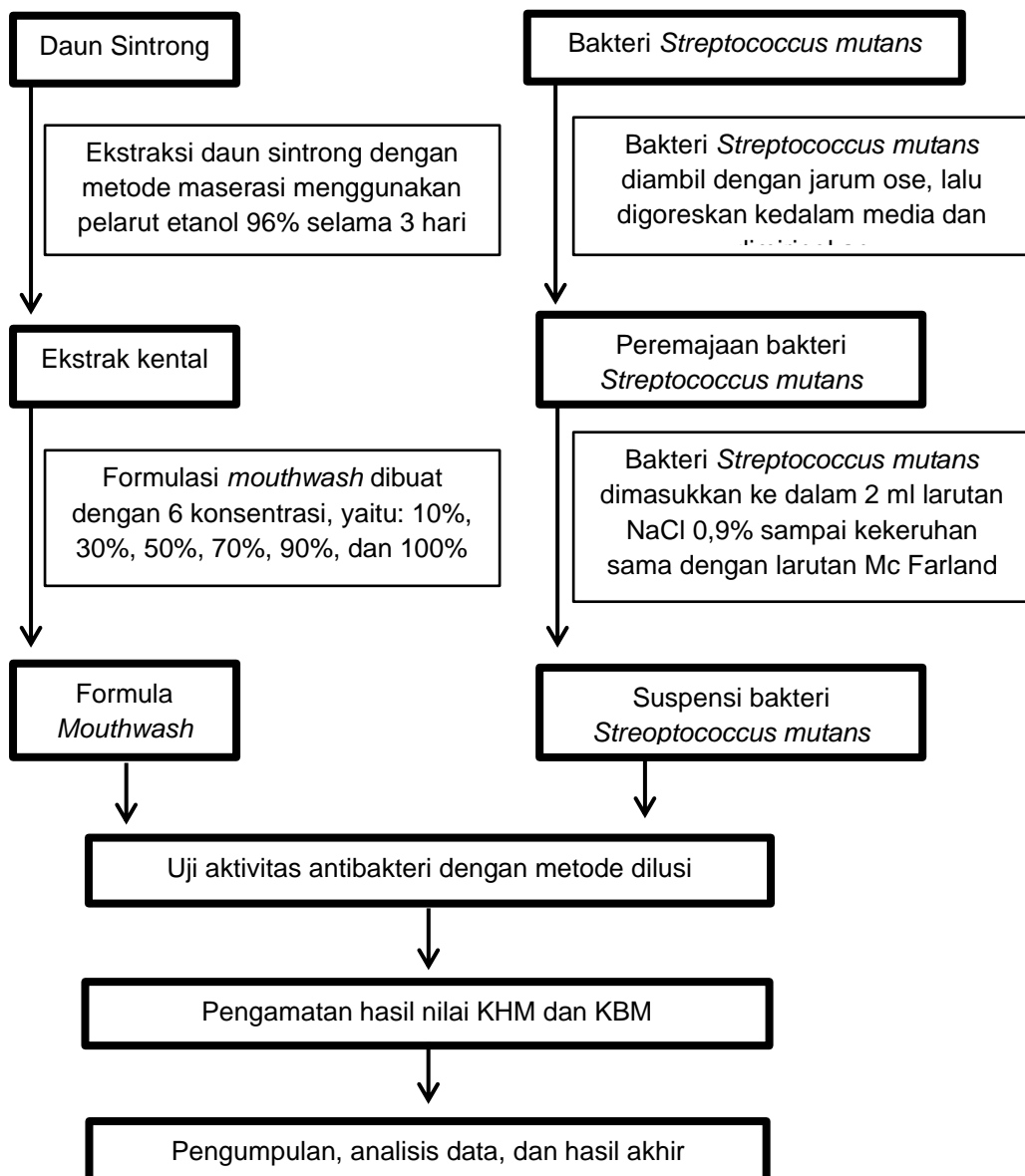
Analisis data dilakukan untuk mengetahui sebaran data dari variabel-variabel yang dianalisis, yaitu variabel bebas (ekstrak daun sintrong) dan variabel terikat (nilai KHM dan KBM). Data dianalisis dengan cara mengamati kekeruhan pada media dan dilihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri. Hasil data yang didapatkan dari

beberapa variasi konsentrasi tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam tabel dan dianalisis hasilnya.

## H. Etika Penelitian

Penelitian ini mematuhi pedoman etika penelitian yang telah ditetapkan dan sampel pada penelitian ini tidak menggunakan hewan uji maupun manusia.

## I. Alur Jalannya Penelitian



Gambar 1. Skema Alur Jalannya Penelitian

## J. Jadwal Penelitian

Tabel 2. Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan	Bulan									
		Okt 21	Nov 21	Des 21	Jan 22	Feb 22	Mar 22	Apr 22	Mei 22	Jun 22	Jul 22
1.	Persiapan Proposal										
2.	Seminar Proposal										
3.	Pengumpulan Bahan dan Penelitian										
4.	Penyusunan Hasil dan Pembahasan										
5.	Seminar Hasil										