

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan studi eksperimental. Sampel penelitian yang digunakan berupa sediaan permen jelly dari ekstrak etanol daun sintrong yang dibuat dengan metode maserasi.

Dalam penelitian ini uji aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi yang meliputi dua tahap, yaitu penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan konsentrasi 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%. Selain itu, penelitian menggunakan bakteri *Streptococcus mutans* sebagai pengujian aktivitas antibakteri. Data pengujian diperoleh dengan melihat kekeruhan. Konsentrasi paling rendah yang menunjukkan kejernihan adalah KHM. Serta mengamati ada atau tidaknya zona bunuh pertumbuhan bakteri pada media padat adalah KBM yang dihasilkan oleh sampel yang digunakan.

B. Subjek dan Objek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sintrong yang dibuat oleh peneliti di Laboratorium Kimia Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur. Objek penelitian ini adalah aktivitas antibakteri permen jelly dari ekstrak etanol daun sintrong terhadap *Streptococcus mutans*.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2022 – Juni 2022, yang dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

- a. Sediaan permen jelly ekstrak etanol daun sintrong

2. Variabel pengganggu
 - a. Suhu dan waktu inkubasi
 - b. Alat dan ruang kerja
 - c. pH media
 - d. kontaminasi
3. Variabel terikat
 - a. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)
 - b. Nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

E. Definisi Operasional

1. Sediaan permen jelly ekstrak daun sintrong merupakan sediaan yang dibuat dengan bahan pembentuk gel, pemanis, dan pengaroma dengan tambahan ekstrak daun sintrong sebagai zat aktif.
2. Kontaminasi adalah adanya bahan, pengotor, atau zat lain yang dapat membahayakan, mengganggu, menginfeksi, atau membuat bahan, lingkungan, atau objek lain tidak sesuai.
3. Aktivitas antibakteri adalah kemampuan permen jelly dari ekstrak etanol daun sintrong untuk menghambat mikroba uji *Streptococcus mutans*.
4. Zona hambat adalah zona jernih di sekitar sumuran pada media yang ditambah dengan sediaan permen jelly dari ekstrak etanol daun sintrong, tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dilihat dari kejernihan media.
5. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari sediaan permen jelly ekstrak etanol daun sintrong yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dilihat adanya pertumbuhan bakteri pada uji penegasan penentuan KHM dan KBM.
6. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)) adalah konsentrasi terendah dari sediaan permen jelly ekstrak etanol daun sintrong yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*

dilihat adanya pertumbuhan bakteri pada uji penegasan penentuan KHM dan KBM.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

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

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sintrong, etanol 96%, aquades, gelatin, asam sitrat, stevia, fruktosa, *Tutti frutti dry flavor*, bakteri *Streptococcus mutans* dari Stikes Samarinda, medium *NA*, medium *NB*

G. Metode Pengumpulan Data

1. Pengambilan Sampel Daun

Sampel yang digunakan adalah daun sintrong dari Desa Loa Kulu Dalam Kecamatan Loa Kulu, Kabupaten Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur. Daun yang diambil adalah daun hijau yang segar.

2. Pengolahan Sampel

Daun sintrong yang telah dipetik dibersihkan kemudian dipisahkan dari kotoran yang menempel pada sampel daun, lalu dicuci dengan air mengalir, kemudian keringkan dengan cara dianginkan. Setelah kering, lalu diserbukkan kemudian sampel siap untuk diekstraksi.

3. Ekstraksi Sampel

Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Masukkan sampel serbuk daun sintrong sebanyak 500 gram ke dalam wadah maserasi (toples) dan tambahkan pelarut etanol 96% sampai

semua sampel terendam seluruhnya dan tertutup rapat. Diamkan selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk. Saring dan dipisahkan filtrat beserta ampas yang ada. Selanjutnya lakukan kembali menggunakan penyari yang sama. Lakukan sebanyak 2 kali berturut-turut. Ekstrak etanol 96% yang diperoleh dipekatkan pada *rotary evaporapor* hingga ekstrak menjadi agak kental, kemudian dilanjutkan dipekatkan dalam *waterbath* hingga menjadi ekstrak yang pekat (Tetti, 2015).

4. Formulasi Permen Jelly

- a. Formula permen jelly dilihat dari penelitian Dhina dkk, (2019) dapat dilihat pada Tabel 3.1

Tabel 3. 1. Formula Permen Jelly

Bahan	Konsentrasi (%)						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
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
Stevia (Pemanis)	2,2	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
<i>Tutti frutti dry flavor</i> (Pengaroma dan rasa)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Aquadest ad (Pelarut)	50	50	50	50	50	50	50

- b. Pembuatan permen jelly dalam 100 gram (Agistia dkk, 2015).
- 1) Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan lebih dahulu.
 - 2) Masukkan aquadest, stevia, dan fruktosa kedalam wadah dan aduk sampai larut
 - 3) Gelatin sedikit demi sedikit ditambahkan sambil sesekali diaduk untuk mendapatkan campuran yang baik.
 - 4) Kemudian, selama 5-10 menit dalam suhu 100°C, larutan terus diaduk hingga terbentuknya massa jelly. Pengadukan dilakukan di atas api kecil.

- 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 $\pm 40\text{-}50^{\circ}\text{C}$ selama 10-15 menit
- 7) Tuangkan ke dalam cetakan dan biarkan selama 15-30 menit pada massa yang telah terbentuk di dalam suhu ruang.
- 8) Masukkan ke dalam lemari pendingin selama 12 jam dalam suhu 5°C .
- 9) Permen jelly yang sudah terbentuk dikeluarkan dari cetakan, masukkan kedalam wadah, dan ditutup rapat

5. **Penyiapan Aktivitas Antibakteri Sediaan Permen Jelly dari Ekstrak Etanol Daun Sintrong**

Dalam pengujian aktivitas antibakteri pada sediaan permen jelly ekstrak etanol daun sintrong, diperlukan penyiapan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* sebelum digunakan untuk pengujian, yang dilihat pada penelitian Handayani dkk, (2016).

a. Sterilisasi Alat

Keringkan alat secara terbalik, setelah dibersihkan sesuai kebutuhan. Bungkus dengan aluminium foil apabila sudah kering. Pertama, kapas bersih digunakan untuk menutupi tabung reaksi dan labu Erlenmeyer. Alat gelas disterilkan dalam oven 170°C selama 1 jam. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Gunakan bunsen untuk mensterilkan jarum ose.

b. Peremajaan Bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri uji diregenerasi dalam media NA. Satu ose mikroorganisme uji, diinokulasikan ke dalam medium NA dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

Peremajaan dilakukan didalam *Laminar Air Flow* (LAF) dengan kondisi yang steril.

c. Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan (Larutan *Mc. Farland*)

Sebanyak 9,5 ml Larutan H_2SO_4 dicampur dengan larutan $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ sebanyak 0,5 ml dalam erlenmeyer. Kemudian divortex hingga memiliki bentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini digunakan sebagai standar kekeruhan dalam uji suspense bakteri.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus mutans*

Setelah mikroorganisme uji diremajakan selama 24 jam, disentrifugasi selama 15 menit sampai terbentuk endapan bakteri. Sampel kemudian divortex dalam tabung reaksi yang berisi 2 mL NaCl fisiologis 0,9 persen. Suspensi bakteri dibandingkan dengan *Mc. Farland* standar.

6. Pengujian Aktivitas Permen Jelly dari Ekstrak Daun Sintrong terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sintrong dalam komposisi permen jelly diselidiki dalam penelitian ini. Pendekatan pengenceran cair digunakan. Metode ini menentukan KHM dan KBM yang dilihat pada penelitian Rollando (2019).

a. Uji KHM

Siapkan beberapa tabung reaksi yang sudah steril. Selanjutnya tiap masing-masing tabung diisi dengan 2 mL medium NB. Selanjutnya ditambahkan 1 mL larutan uji (sediaan permen jelly dari ekstrak daun sintrong) dengan konsentrasi 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%. Kemudian masing-masing tabung ditambahkan 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dan di vortex. Untuk membuat kontrol positif dibuat dengan menggunakan media NB sebanyak 2 ml yang ditambahkan dengan 1 ml *chlorohexidine* 0,2%, kemudian ditambahkan 1 ml biakan bakteri *Streptococcus mutans*. Sedangkan untuk membuat kontrol negatif, dilakukan dengan

menambahkan 2 ml biakan bakteri *Streptococcus mutans* ke dalam 2 ml media NB. Dan untuk membuat kontrol media, dilakukan hanya dengan media NB tanpa adanya bakteri. Setelah itu, semua larutan uji, kontrol positif dan kontrol negatif diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah 24 jam amati kekeruhan pada larutan. Konsentrasi paling rendah yang menunjukkan kejernihan adalah KHM.

b. Uji KBM

Dalam pengujian KBM, dilakukan dengan cara larutan uji di mikropipet sebanyak 1 ml ke dalam media NA yang sudah disiapkan dalam cawan petri. Larutan yang digunakan merupakan larutan uji penentuan KHM yang menunjukkan kejernihan. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, amati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada media agar yang ditandai dengan ada atau tidaknya daerah atau bintik berwarna putih pada media agar.

Menurut CLSI (2012) dalam metode *Macrodilution (tube) broth* digunakan tabung reaksi 13 x 100 mm untuk melakukan pengujian. Gunakan tabung kontrol pertumbuhan yang berisi media tanpa bahan antimikroba untuk setiap organisme yang diuji. Kemudian untuk volume akhir dari setiap pengenceran (dilusi) diperlukan minimum 1 mL untuk pengujian. Gunakan satu pipet untuk mengukur semua pengencer dan untuk menambahkan larutan antimikroba ke tabung pertama. Untuk setiap langkah berikutnya, gunakan pipet baru

H. Teknik Analisis Data

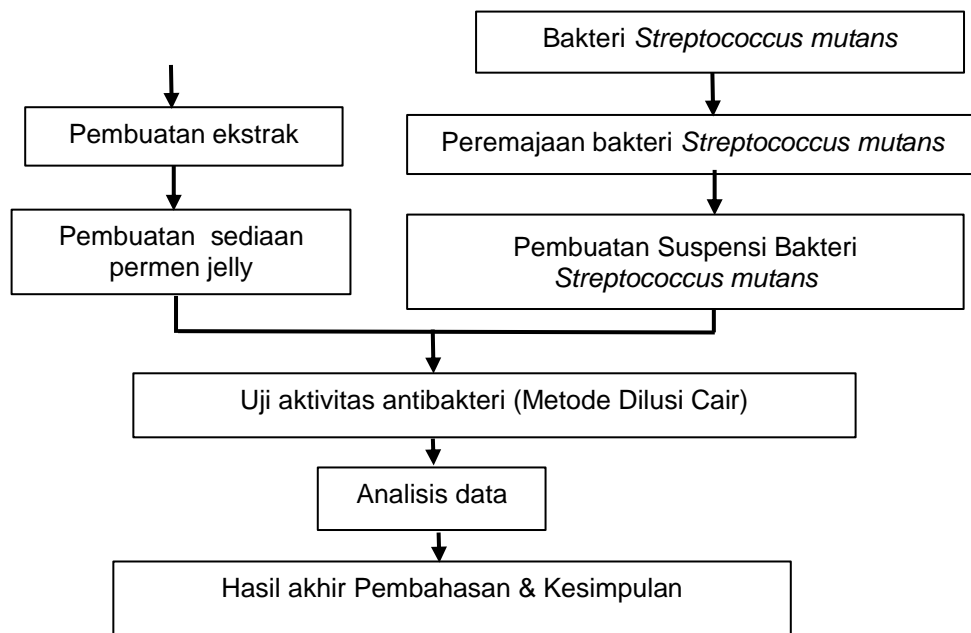
Data aktivitas antibakteri dalam penentuan nilai KHM diperoleh dengan cara mengamati kejernihan yang disamakan dengan kejernihan pada kontrol media. Sedangkan dalam penentuan nilai KBM, mengamati media padat dari nilai KHM yang menunjukkan

Daun sintrong

kejernihan akan menghasilkan ada atau

tidaknya zona bunuh pada media padat. Dari hasil penelitian yang dilakukan, data dimasukkan ke dalam tabel.

I. Alur Jalannya Penelitian



Gambar 3. 1. Alur Jalannya Penelitian

J. Jadwal Penelitian

Tabel 3. 2. Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan Penelitian	Bulan						
		Nov	Des	Feb	Mar	April	Mei	Juni
1	Pengajuan Judul	■						
2	Penyusunan Proposal		■					
3	Pencarian Sampel Daun Sintrong			■				
4	Pengolahan Sampel				■	■		
5	Pembuatan Ekstrak				■	■		
6	Pembuatan Formulasi Permen Jelly						■	
7	Pengujian Aktivitas Antibakteri							■
8	Pengumpulan Data							■
9	Analisis Data							■
10	Penyusunan Laporan							■