

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Disain Penelitian

Disain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental murni secara laboratoris *in vitro*.

B. Bahan Uji dan Bakteri Uji

1. Bahan uji yang digunakan adalah obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) dengan 5 konsentrasi yaitu 10%, 25%, 50%, 75% dan 100%.
2. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *Enterococcus faecalis* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Tempat Penelitian
 - a. Tanaman *M. pendens* adalah tanaman yang diperoleh dari Papua, Indonesia
 - b. Pembuatan ekstrak tanaman *M. pendens* dan pembuatan sediaan obat kumur tanaman *M. pendens* dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
 - c. Pembuatan sampel kultur bakteri *E. faecalis* dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

d. Pelaksanaan uji aktivitas antibakteri obat kumur ekstrak tanaman *M. pendens* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2016 sampai dengan bulan Januari 2017.

D. Variabel dan Definisi Operasional

a. Variabel

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak etanol tanaman *M. pendens* dalam obat kumur dengan konsentrasi 10%, 25%, 50%, 75% dan 100%.

2. Variabel Terpengaruh

a. Kadar Hambat Minimal (KHM) bakteri *E. faecalis*

b. Kadar Bunuh Minimal (KBM) bakteri *E. faecalis*

3. Variabel Terkendali

a. Obat kumur ekstrak etanol tanaman *M. pendens*

b. Suhu inkubator 37° C

c. Waktu inkubasi 18 - 24 jam

d. Konsentrasi larutan *E. faecalis* (10^6 CFU/ml)

e. Jenis medium pembiakan bakteri BHI

f. Media pertumbuhan bakteri

g. Volume obat kumur tanaman *M. pendens* (50 ml)

- h. Konsentrasi zat aktif dalam sediaan obat kumur
 - i. Tanaman *M. pendens* yang digunakan berasal dari tempat yang sama.
- b. Definisi Operasional
1. Ekstrak etanol tanaman *M. pendens* adalah sari pekat dari tanaman *M. pendens* dimana didapat zat aktif yang terkandung dalam tanaman *M. pendens* dengan menggunakan metode maserasi
 2. Obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut *M. pendens* adalah cairan yang digunakan untuk membersihkan rongga mulut dengan kandungan ekstrak etanol *M. pendens* dengan beberapa campuran seperti bahan perasa, pemanis, pengawet, dan aquades hingga volume 50 ml.
 3. Kadar Hambat Minimal adalah konsentrasi terendah dari ekstrak etanol tanaman *M. pendens* yang menunjukkan adanya menghambat pertumbuhan bakteri *E. faecalis* dan diamati berdasarkan tingkat kekeruhan pada tabung yang dilakukan dengan metode dilusi cair.
 4. Kadar Bunuh Minimal adalah konsentrasi minimal dari ekstrak etanol tanaman *M. pendens* yang dapat membunuh bakteri *E. faecalis* diamati berdasarkan tidak adanya koloni bakteri pada media agar yang dilakukan dengan metode dilusi cair.
 5. Bakteri *E. faecalis* adalah bakteri *anaerob facultatif* berbentuk kokus gram positif tunggal, berpasangan atau yang membentuk rantai dengan

diameter 0,5-1 μm . Bakteri *E. faecalis* yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil biakan alami Balai Laboratorium Kesehatan (BLK).

E. Alat dan Bahan

1. Alat penelitian:

- | | |
|--------------------------|------------------------------------|
| a. Ose steril | o. Rak tabung |
| b. Lampu spritus | p. Tabung reaks |
| c. Corong <i>buncher</i> | q. Pipet ukur dan pro pipet |
| d. Kertas saring | r. Timbangan digital |
| h. <i>Waterbath</i> | s. <i>Laminar Flow</i> |
| i. Inkubator | t. <i>Rotary vaccum evaporator</i> |
| k. Cawan porselen | u. <i>Viscometer</i> |
| l. Blender | v. Gelas ukur 100 ml |
| m. Gelas beker | w. Tabung erlenmeyer 100 ml |
| n. Almari pengering | x. Labu takar 50 m |

2. Bahan penelitian :

- a. Bakteri *Enterococcus faecalis*
- b. Tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens*)
- c. Etanol 70%
- d. Aquades steril
- e. Na-Lauril Sulfat`
- f. Sorbitol
- g. *Chlorhexidine gluconate 0.2%*
- h. *Peppermint oil* (perasa)
- i. Asam Benzoat (pengawet)
- j. *Media Brain Heart Infusion*
- k. *Media Trypticase Soy Agar*

- l. *Handscoon*
- m. Kapas
- n. Masker

F. Jalannya Penelitian

1. Persiapan Penelitian

Persiapan alat dan bahan serta sterilisasi alat dan diri.

2. Identifikasi Tanaman

Tanaman *M. pendens* yang sudah dikumpulkan, diambil beberapa sampel untuk dilakukan taksonomi tanaman.

3. Pembuatan ekstrak tanaman *M. pendens*

Pembuatan yang dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

- a. Tanaman *M. pendens* 1000 gram yang sudah dipilih dibersihkan dengan air mengalir dan dipotong-potong. Tanaman *M. pendens* yang sudah kering dijadikan serbuk dengan cara tanaman digiling menggunakan blende. Tanaman sarang semut yang sudah menjadi serbuk dilakukan proses penyaringan lemak sebelum proses maserasi dengan cara merendam serbuk sarang semut dengan petroleum eter untuk menghilangkan lipid agar tidak mengganggu proses penyaringan. Setelah itu, kemudian dilakukan proses maserasi selama 24 jam yaitu dengan penambahan etanol 70% sebanyak 1L pada serbuk tanaman *M. pendens* dan pengadukan selama 30 menit. Hasil yang sudah diperoleh

lalu disaring sebanyak 3 kali dengan menggunakan corong *buncher*. Filtrat I diuapkan menggunakan waterbath, sedangkan ampasnya dimaserasi kembali selama 24 jam menggunakan pelarut yang sama. Filtrat disaring dan didapatkan filtrat ke II. Filtrat I dan II dicampur lalu diuapkan pada suhu 60 – 70⁰C hingga di peroleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%.

- b. Kemudian ekstrak tanaman *M. pendens* diencerkan dengan etanol 70 sesuai dengan konsentrasi esktrak etanol 10%, 25%, 50%, 70% dan 100%.

4. Pembuatan Obat Kumur

Tanaman *M. pendens* yang sudah diekstrak menjadi konsentrasi 10%, 25%, 50%, 75%, dan 100% selanjutnya dibuat dalam formula obat kumur. Kandungan dalam obat kumur tersebut menggunakan 5 formula yaitu,

Tabel 1. Formula Obat Kumur Ekstrak Etanol Tanaman (*Mermecodia pendens* Merr. & Perry)
(Jones , Pharmaceutical Solutions for Oral Administration, 2014)

	Formula	Formula	Formula	Formula	Formula
Bahan	I	II	III	IV	V
	10%	25%	50%	75%	100%
Ekstrak Etanol (ml)	5	12.5	25	37.5	50
<i>Peppermint oil</i> (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Na-Lauril Sulfat (gr)	1	1	1	1	1
Asam Benzoat (gr)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Sorbitol (ml)	5	5	5	5	5
Twin 80 (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Aquades ad (ml)	60	60	60	60	60
Volume Akhir (ml)	60	60	60	60	60

a. Formula I

Ekstrak tanaman sarang semut konsentrasi 10% sebanyak 5 ml dan Na-lauril sulfat 1 gr yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml menggunakan tabung *Erlenmeyer* diatas kompor. *Peppermint oil* 0,5 ml ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran pertama sambil diaduk. Selanjutnya sorbitol 5 ml + Asam Benzoat 0,025 gram dan tween 0,3 ml ditambahkan dalam campuran dan diaduk sampai homogen. Larutan yang dihasilkan kemudian ditambahkan aquades sampai volumenya 60 ml.

b. Formula II

Ekstrak tanaman sarang semut konsentrasi 25% sebanyak 12,5 ml dan Nalauril sulfat 1 gr yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml menggunakan tabung *Erlenmeyer* diatas kompor. *Peppermint oil* 0,5 ml ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran pertama sambil diaduk. Selanjutnya sorbitol 3 ml + Asam Benzoat 0,025 gram dan tween 0,3 ml ditambahkan dalam campuran dan diaduk sampai homogen. Larutan yang dihasilkan kemudian ditambahkan aquades sampai volumenya 60 ml.

c. Formula III

Ekstrak tanaman sarang semut konsentrasi 50% sebanyak 25 ml dan Nalauril sulfat 1 gr yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml menggunakan tabung *Erlenmeyer* diatas kompor. *Peppermint oil* 0,5 ml ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran pertama sambil diaduk. Selanjutnya sorbitol 5 ml + Asam Benzoat 0,025 gram dan tween 0,3 ml ditambahkan dalam campuran dan diaduk sampai homogen. Larutan yang dihasilkan kemudian ditambahkan aquades sampai volumenya 60 ml.

d. Formula IV

Ekstrak tanaman sarang semut konsentrasi 75% sebanyak 37,5 ml dan Nalauril sulfat 1 gr yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril

sebanyak 10 ml menggunakan tabung *Erlenmeyer* diatas kompor. *Peppermint oil* 0,5 ml ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran pertama sambil diaduk. Selanjutnya sorbitol 5 ml + Asam Benzoat 0,025 gram dan tween 0,3 ml ditambahkan dalam campuran dan diaduk sampai homogen. Larutan yang dihasilkan kemudian ditambahkan aquades sampai volumenya 60 ml.

e. Formula V

Ekstrak tanaman sarang semut konsentrasi 100% sebanyak 50 ml dan Na-lauril sulfat 1 gr yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml menggunakan tabung *Erlenmeyer* diatas kompor. *Peppermint oil* 0,5 ml ditambahkan sedikit ke dalam campuran pertama sambil diaduk. Selanjutnya sorbitol 0,15 ml + Asam Benzoat 0,025 gram ditambahkan dalam campuran dan diaduk sampai homogen. Larutan yang dihasilkan kemudian ditambahkan aquades sampai volumenya 60 ml.

5. Pemiakan Bakteri *Enterococcus faecalis*

Koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yang sudah dikembangbiakkan di Balai Laboratorium Laboratorium Kesehatan, Yogyakarta. Bakteri diambil dengan menggunakan ose steril sebanyak 1-2 ml kemudian dimasukkan kedalam *Brain Heart Infussion* (BHI) yang sudah disterilkan, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada inkubator pada suhu 37°C. Selanjutnya

dilakukan uji spektrofotometer dengan panjang gelombang $\lambda 595$ visibel untuk mendapatkan hasil bakteri 10^6 CFU/ml.

Perhitungan pengenceran :
 $V1 \times N1 = V2 \times N2$

Keterangan:

V1 = volume larutan 1

V2 = volume larutan 2

N1 = konsentrasi/kadar larutan 1

N2 = konsentrasi/kadar larutan 2

6. Uji Aktivitas Daya Antibakteri

Uji daya antibakteri ekstrak tanaman *M. pendens* dengan metode pengenceran tabung (*Tube dilution method*) sebagai berikut:

- a. Disediakan 27 tabung steril dengan 3 kali pengulangan, dimana setiap pengenceran dalam satu kali pengulangan menggunakan 5 tabung dan 4 tabung untuk sisa pengenceran, kontrol pertumbuhan kuman (kontrol negatif), kontrol *Chlorhexidine gluconat* 0,2% (kontrol positif), kontrol media dan kontrol bakteri. Pengenceran pertama untuk menguji kadar hambat minimal dan kadar bunuh minimal dari obat kumur ekstrak tanaman *M. pendens*.
- b. Persiapan tabung uji: disiapkan 5 tabung reaksi steril (4 untuk kontrol):
 - 1) Tabung I diisi 1 ml Formula I + 1 ml suspensi bakteri *E. faecalis* 10^6 CFU/ml.
 - 2) Tabung II diisi 1 ml Formula II + 1 ml suspensi bakteri *E. faecalis* 10^6 CFU/ml.

- 3) Tabung III diisi 1 ml Formula III + 1 ml suspensi bakteri *E. faecalis* 10^6 CFU/ml.
 - 4) Tabung IV diisi 1 ml Formula IV + 1 ml suspensi bakteri *E. faecalis* 10^6 CFU/ml.
 - 5) Tabung V diisi 1 ml Formula V + 1 ml suspensi bakteri *E. faecalis* 10^6 CFU/ml.
 - 6) Tabung VI diisi 1 ml *Chlorhexidine gluconate* 0.2% + 1 ml suspensi bakteri *E. faecalis* 10^6 CFU/ml (kontrol +)
 - 7) Tabung VII diisi 1 ml formula dasar obat kumur tanpa ekstrak etanol tanaman sarang semut konsentrasi 0% + 1 ml suspensi bakteri *E. faecalis* 10^6 CFU/ml (kontrol -)
 - 8) Tabung VIII diisi 1 ml larutan BHI + 1 ml formula obat kumur 100% (Kontrol Media)
 - 9) Tabung IX diisi 1 ml BHI + 1 ml suspensi bakteri *E. faecalis* 10^6 CFU/ml (Kontrol Bakteri)
- c. Semua tabung selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C .
- d. Pengamatan dilakukan setelah proses inkubasi selama 24 jam selesai untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri *E. faecalis* dengan cara membandingkan kadar kekeruhan dengan kontrol positif.

- e. Kadar Hambat Minimal didapat dengan mengamati tabung subkultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri yaitu ditunjukkan dengan warna jernih dengan konsentrasi terendah.
- f. Tabung-tabung subkultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan kuman selanjutnya ditanam dengan menggunakan ose steril pada media TSA.
- g. Setelah ditanam pada media TSA diinkubasi lagi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- h. Kadar Bunuh Minimal akan ditunjukan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media TSA pada konsentrasi terendah.

Pembacaan kadar hambat minimal ditentukan dengan melihat kekeruhan pada cairan di dalam tabung reaksi yang dibandingkan dengan kontrol standar.

Pembacaan nilai didasarkan pada:

- a. Tanda negatif (-) : dengan melihat adanya kejernihan pada tabung menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *E. faecalis* sehingga obat kumur ekstrak etanol tanaman *M. pendens* dapat menghambat pertumbuhan bakteri.
- b. Tanda positif (+) : dengan melihat adanya kekeruhan pada tabung menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *E. faecalis* sehingga obat

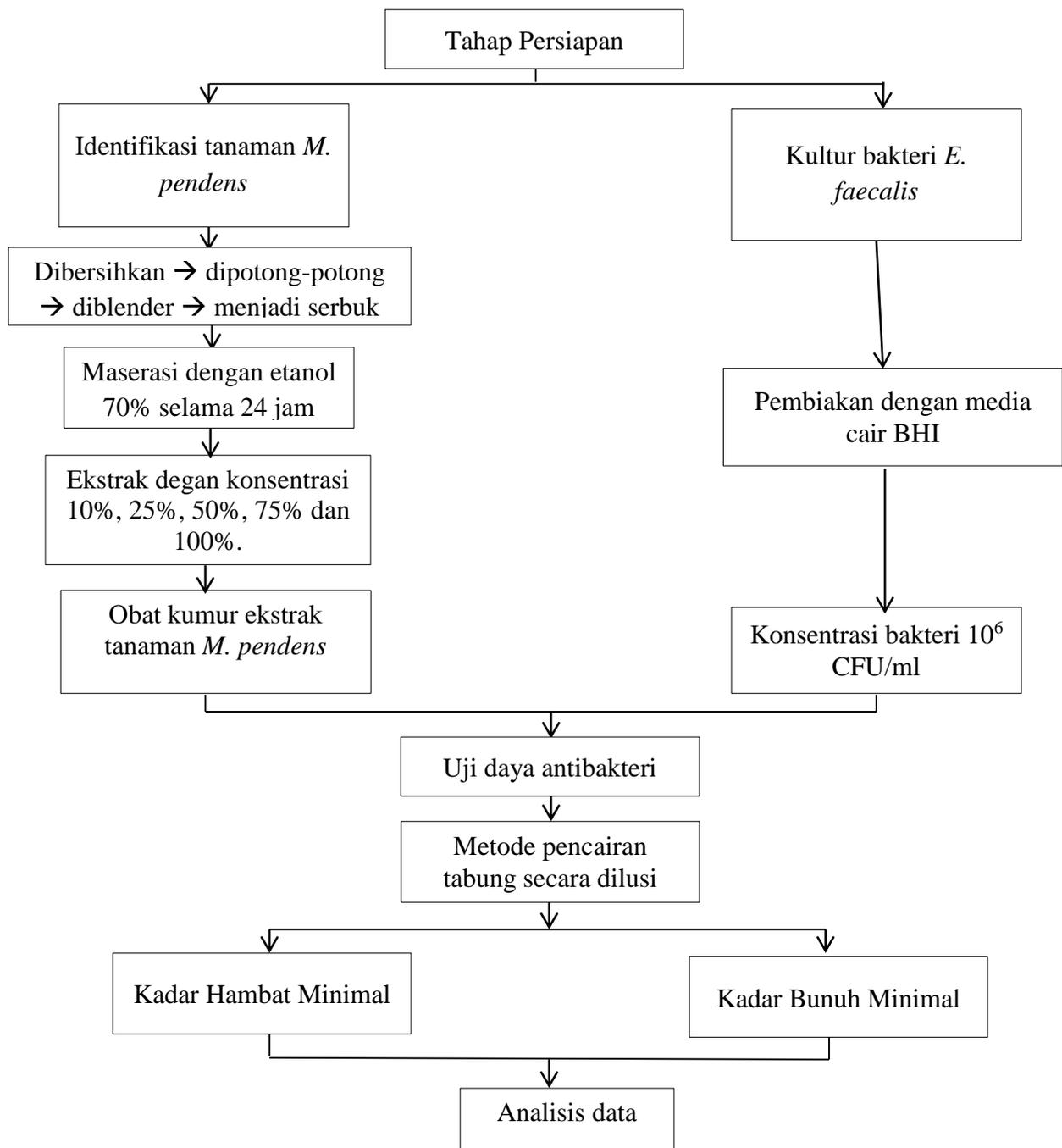
kumur ekstrak etanol tanaman *M. pendens* tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

- c. Pembacaan KBM dapat ditentukan dengan menguji bahan menggunakan konsentrasi terkecil dari bahan uji yang masih dapat membunuh bakteri. Hal ini ditunjukkan dengan ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri *E. faecalis* pada media TSA .

G. Analisis Data

Analisis data untuk mengukur KHM dan KBM dari obat kumur ekstrak etanol tanaman *M. pendens* menggunakan uji deskriptif terhadap bakteri *E. faecalis*.

H. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian