

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 *Lactobacillus acidophilus* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Tempat Penelitian
 - a. Tanaman sarang semut adalah tanaman yang diperoleh dari Papua Indonesia.
 - b. Identifikasi tanaman sarang semut yang dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
 - c. Pembuatan ekstrak etanol dan obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
 - d. Pembuatan sampel kultur bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

- e. Pelaksanaan uji aktivitas antibakteri obat kumur ekstrak tanaman sarang semut dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi 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 sarang semut (*Myrmecodia pendens Merr. & Perry*) dalam obat kumur dengan konsentrasi 10%, 25%, 50%, 75%, dan 100%.

2. Variabel Terpengaruh

- a. Kadar hambat minimal (KHM) *Lactobacillus acidophilus*
- b. Kadar bunuh minimal (KBM) *Lactobacillus acidophilus*

3. Variabel Terkendali

- a. Obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut.
- b. Suhu inkubator 37° C
- c. Waktu inkubasi 18 - 24 jam
- d. Konsentrasi larutan *Lactobacillus acidophilus* (10⁶ CFU/ml)
- e. Jenis medium pembiakan bakteri BHI (*Brain Heart Infusion*)
- f. Media pertumbuhan bakteri

- g. Volume obat kumur (50 ml)
- h. Konsentrasi zat aktif dalam sediaan obat kumur
- i. Tanaman sarang semut yang digunakan berasal dari tempat yang sama

b. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol tanaman sarang semut adalah sari pekat dari tanaman sarang semut yang berisi zat aktif dari dalam tanaman tersebut yang dibuat dengan metode maserasi.
2. Obat kumur ekstrak etanol sarang semut adalah sediaan obat kumur yang dibuat dari campuran ekstrak etanol tanaman sarang semut yang dicampur dengan zat-zat lainnya sehingga dapat berfungsi untuk menghambat maupun membunuh bakteri.
3. Kadar hambat minimal (KHM) adalah konsentrasi terendah dari obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang dilakukan dengan metode dilusi cair.
4. Kadar bunuh minimal (KBM) adalah konsentrasi terendah dari obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut yang dapat membunuh bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang dilakukan dengan metode dilusi cair.
5. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri gram positif yang dapat tumbuh dalam keadaan anaerob, bakteri ini di kultur di Balai

Laboratorium Kesehatan Yogyakarta dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml yang kemudian diencerkan menjadi 10^6 CFU/ml.

A. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian :

- | | |
|--------------------------|------------------------------------|
| a. Ose steril | m. <i>Micropipette</i> |
| b. Lampu spiritus | n. Pipet ukur dan pro pipet |
| c. Kertas saring | o. Timbangan digital |
| d. Corong <i>buncher</i> | p. <i>Laminar flow UV</i> |
| e. Inkubator | q. <i>Rotary vaccum evaporator</i> |
| f. <i>Waterbath</i> | r. <i>Viscometer</i> |
| g. Blender | s. <i>Erlenmeyer 100 ml</i> |
| h. Gelas beker | t. Gelas ukur 100 ml |
| i. Cawan porselen | u. <i>Blue tip</i> |
| j. Almari pengering | v. Spektrofotometer |
| k. Rak tabung | |
| l. Tabung reaksi | |

2. Bahan penelitian :

- a. Tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans Merr. & Perry*)
- b. Bakteri *Lactobacillus acidophilus*
- c. Etanol 70%
- d. Aquades steril
- e. *Chlorhexidine gluconate 0,2%*
- f. Peppermint oil (perasa)
- g. Asam benzoat (pengawet)
- h. Sorbitol (pemanis)
- i. Na-lauril sulfat (penjernih)
- j. Tween 80
- k. Media *Brain Heart Infussion (BHI)*
- l. *Media Trypticase Soy Agar (TSA)*

B. Jalannya Penelitian

1. Persiapan

Penyiapan alat dan bahan serta sterilisasi alat dan diri.

2. Identifikasi Tanaman

Tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens Merr. & Perry*) yang sudah dikumpulkan diambil beberapa sampel untuk dilakukan taksonomi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Sarang Semut

- a. Tanaman sarang semut sebanyak 1000 gram yang didapatkan sudah dalam bentuk kering kemudian dihancurkan menggunakan blender. Tanaman sarang semut yang telah menjadi serbuk ini dilakukan proses pengawalemakan sebelum proses maserasi dengan cara merendam serbuk sarang semut dengan petroleum eter untuk menghilangkan lipid agar tidak mengganggu proses penyaringan. Setelah proses pengawalemakan, kemudian dilakukan proses maserasi selama 24 jam menggunakan ekstrak etanol 70% sebanyak 1 liter selama 30 menit. Hasil yang diperoleh kemudian disaring menggunakan corong *buncher*. Filtrat I diuapkan menggunakan *waterbath*, sedangkan ampasnya dimaserasi kembali selama 24 jam menggunakan pelarut yang sama. Filtrat kemudian disaring dan didapatkanlah filtrat ke II. Setelah itu dilakukan pencampuran filtrat I

dan II kemudian diuapkan pada suhu 60° - 70°C hingga diperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%.

- b. Kemudian ekstrak etanol tanaman sarang semut ini diencerkan dengan menggunakan aquades sesuai rumus pengenceran menjadi beberapa konsentrasi sesuai yang telah ditentukan yaitu 10%, 25%, 50%, 75%, dan 100%.

4. Pembuatan Obat Kumur

Tanaman sarang semut yang telah di ekstrak di laboratorium kemudian dibuat dalam bentuk obat kumur dengan tambahan berbagai bahan. Obat kumur dibuat dalam bentuk 5 formula dengan kandungan dari obat kumur tersebut sesuai pada Tabel 1.

Tabel 1. Formulasi Obat Kumur Ekstrak Etanol Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) (Jones, 2014).

Bahan	Formula	Formula	Formula	Formula	Formula
	I	II	III	IV	V
	10%	25%	50%	75%	100%
Ekstrak Etanol Sarang Semut (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
Tween 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 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 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 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.

d. Formula IV

Ekstrak tanaman sarang semut konsentrasi 75% sebanyak 37,5 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.

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 *Lactobacillus acidophilus*

Koloni bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang sudah dikultur didalam agar miring disiapkan. Beberapa koloni bakteri diambil dengan menggunakan ose steril lalu dimasukkan ke dalam 1-2 ml BHI lalu diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Larutan yang berisi bakteri tersebut kemudian dihitung menggunakan spektrofotometer untuk penghitungan jumlah koloni bakteri dengan pembacaan melalui cahaya yang diserap dengan panjang gelombang 595nm kemudian dilakukan pengenceran sampai mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^6 CFU/ml karena akan digunakan untuk pengujian dilusi cair.

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 sarang semut 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 formula dasar obat kumur (kontrol negatif), kontrol *Chlorhexidine gluconate* 0.2% (kontrol positif), kontrol bakteri, dan kontrol media.

Pengenceran pertama untuk menguji kadar hambat minimal dan kadar bunuh minimal dari obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut.

b. Persiapan tabung uji: disiapkan 9 tabung reaksi steril (4 untuk kontrol):

- 1) Tabung I diisi 1 ml Formula I + 1 ml suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^6 CFU/ml.
- 2) Tabung II diisi 1 ml Formula II + 1 ml suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^6 CFU/ml.
- 3) Tabung III diisi 1 ml Formula III + 1 ml suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^6 CFU/ml.
- 4) Tabung IV diisi 1 ml Formula IV + 1 ml suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^6 CFU/ml.
- 5) Tabung V diisi 1 ml Formula V + 1 ml suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^6 CFU/ml.
- 6) Tabung VI diisi 1 ml *Chlorhexidine gluconate* 0,2% + 1 ml suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^6 CFU/ml (kontrol +).
- 7) Tabung VII diisi 1 ml formula dasar obat kumur tanpa ekstrak tanaman sarang semut + 1 ml suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^6 CFU/ml (kontrol negatif).
- 8) Tabung VIII diisi 1 ml BHI + 1 ml suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^6 CFU/ml (kontrol bakteri).

- 9) Tabung IX diisi 1 ml BHI + 1 ml formula obat kumur (kontrol media).
- 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 *Lactobacillus acidophilus* dengan cara membandingkan kadar kekeruhan dengan kontrol positif.
 - e. Kadar Hambat Minimal (KHM) 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 *Trypticase Soy Agar* (TSA).
 - g. Setelah ditanam pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) diinkubasi lagi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
 - h. Kadar Bunuh Minimal (KBM) akan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) pada konsentrasi terendah.

Pembacaan Kadar Hambat Minimal (KHM) ditentukan dengan melihat kekeruhan pada cairan di dalam tabung reaksi yang dibandingkan dengan kontrol standar. Pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari media

yang menjadi keruh. Semakin subur pertumbuhan bakteri pada tabung reaksi, maka semakin keruh media tersebut.

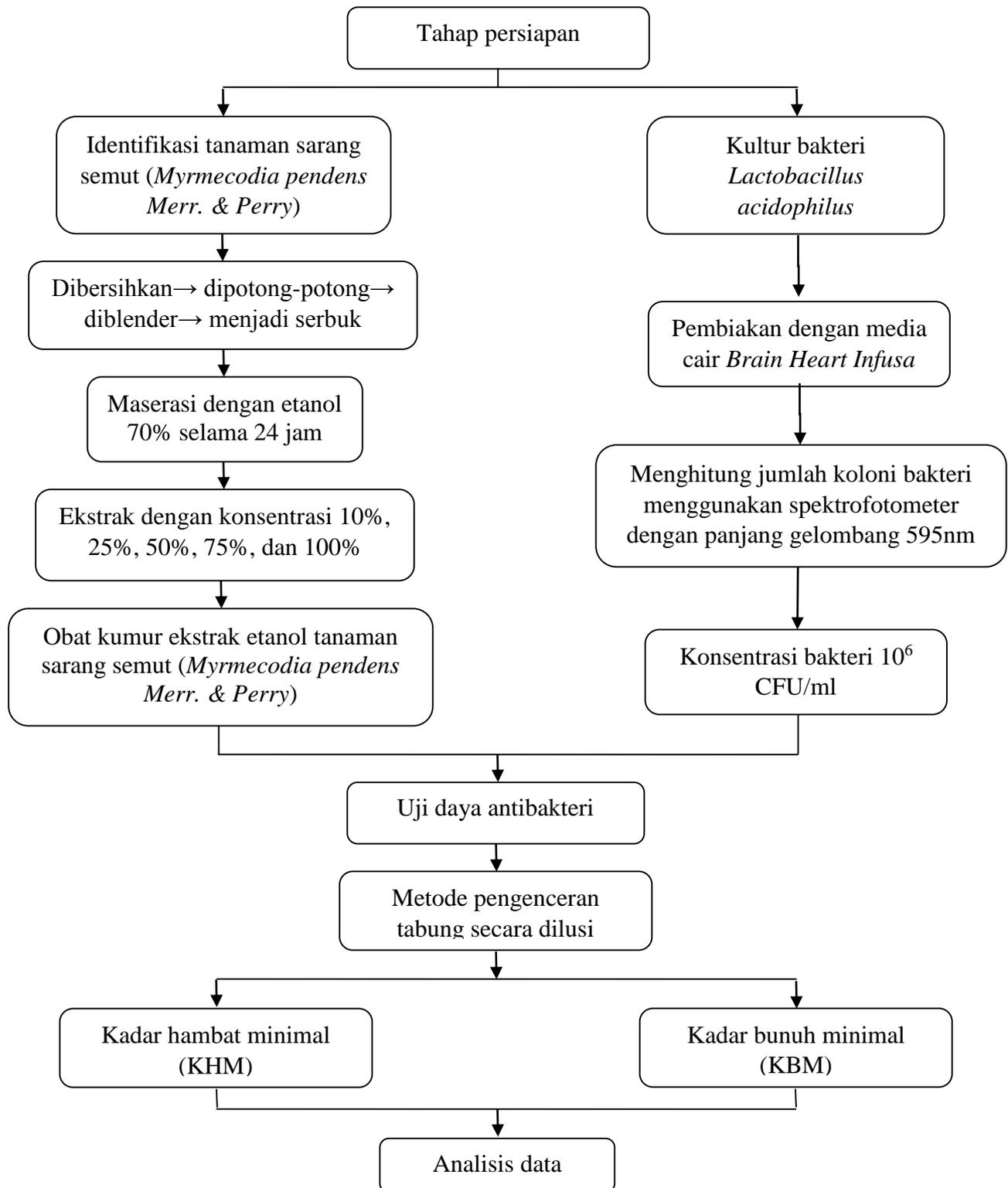
Pembacaan nilai didasarkan pada :

- a. Tanda negatif (-) : dengan melihat adanya kejernihan pada tabung menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sehingga obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut dapat menghambat pertumbuhan bakteri.
- b. Tanda positif (+) : dengan melihat adanya kekeruhan pada tabung menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sehingga obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut 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 *Lactobacillus acidophilus* pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA).

C. Analisis Data

Analisis data untuk mengukur Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens Merr. & Perry*) menggunakan uji deskriptif terhadap bakteri *Lactobacillus acidophilus*.

D. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian