

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain penelitian**

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental murni secara laboratoris dengan *post test only control group desain* tentang pengaruh daya antimikroba obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut terhadap jamur *C.albicans* secara *in vitro*.

#### **B. Bahan uji dan Bakteri uji**

1. Bahan uji yang digunakan adalah obat kumur ekstrak tanaman sarang semut dengan 5 konsentrasi yaitu 10% , 25% , 50% , 75% , 100%
2. Mikroba uji yang digunakan adalah larutan jamur *C.albicans* dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml

#### **C. Tempat dan waktu**

1. Tempat Penelitian
  - a. Tanaman sarang semut sudah disortir dan dipilah sebelum dilakukan pengestrakan.
  - b. Pembuatan ekstrak etanol tanaman sarang semut dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
  - c. Pembuatan sediaan obat kumur tanaman sarang semut dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
  - d. Pembuatan sampel kulturjamur *C.albicans* dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

- e. Pelaksanaan uji aktivitas antimikroba 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 mei sampai dengan juni 2016.

### **D. Variabel dan definisi oprasional**

#### a. Variabel

##### 1. Variabel Pengaruh

Ekstrak etanol tanaman sarang semut dalam obat kumur dengan konsentrasi 10% , 25% , 50% , 75% , 100%

##### 2. Variabel Terpengaruh dalam penelitian ini adalah Jamur *C.albicans*

##### 3. Variabel Terkendali

- a. Obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut
- b. Suhu inkubator 37° C
- c. Waktu inkubasi 18 - 24 jam
- d. Konsentrasi jamur *C.albicans* ( $10^6$  CFU/ml)
- e. Jenis medium pembiakan jamur BHI (*Brain heart infusion*)
- f. Media pertumbuhan jamur
- g. Volume obat kumur tanaman sarang semut (*myrmecodia pendens*) (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 ditambah dengan bahan-bahan lain yang berfungsi untuk menghambat maupun membunuh mikroba.
3. Kadar hambat minimal (KHM) adalah konsentrasi terendah dari obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut yang dapat menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans* 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 jamur *C. albicans* yang dilakukan dengan metode dilusi cair.
5. Jamur *C. albicans* adalah jamur spesies ragi yang paling dominan dalam rongga mulut manusia berbentuk batang, ragi hifa dan klamidospora, jamur ini di kultur di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta dan didapatkan konsentrasi  $10^8$  CFU/ml yang kemudian diencerkan menjadi  $10^6$  CFU/ml.

## E. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Bahan Penelitian:

- a. Tanaman sarang semut

- b. Jamur *C.albicans*
- c. Etanol 70%
- d. Aquades steril
- e. *Chlorhexidine gluconate* 0.2%
- f. *Peppermint oil*(perasa)
- g. Asam Benzoat (pengawet)
- h. Larutan NaCl
- i. Media *Brain Heart Infusion*(BHI)
- j. Media *Trypticase Soy Agar*(TSA)
- k. *handscoon*
- l. Kapas
- m. Masker
- n. Na-lauril sulfat
- o. Sorbitol (pemanis)
- p. Gliserin
- q. Tween 80%
- 2. Alat penelitian:
  - a. Ose steril
  - b. Lampu spritus
  - c. Corong *buncher*
  - d. Kertas saring
  - e. *Waterbath*

- f. Inkubator
- g. Cawan porselen
- h. Blender
- i. Gelas beker
- j. Almari pengering
- k. Rak tabung
- l. Pipet tetes
- m. Pipet ukur dan pro pipet
- n. Timbangan digital
- o. *Laminar Flow*
- p. *Rotary vaccum evaporator*
- q. Viscometer
- r. Gelas ukur 100 ml
- s. Erlenmeyer 100 ml
- t. Labu takar 50 ml
- u. Tabung reaksi

**F. Jalannya penelitian**

1. Persiapan

Penyiapan alat dan bahan serta sterilisasi alat dan operator.

2. Identifikasi Tanaman

Tanaman sarang semut 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 sediaan kering dan kemudian dilakukan pemilihan dan pengambilan bagian umbinya kemudian dibersihkan dan dipotong-potong, kemudian dihancurkan menggunakan blender. Setelah tanaman sarang semut sudah dalam bentuk serbuk dilakukan proses pengawaleman sebelum dilakukan proses maserasi dengan cara merendam serbuk tanaman sarang semut dengan petroleum eter untuk menghilangkan lemak agar tidak mengganggu proses penyaringan. Setelah proses pengawaleman selesai, kemudian dilanjutkan proses maserasi selama 24 jam menggunakan ekstrak etanol 70% sebanyak 1 liter. Hasil yang diperoleh kemudian disaring menggunakan corong *buncher*. Filtrat 1 diuapkan menggunakan waterbath, sedangkan ampasnya dilakukan maserasi kembali selama 24 jam menggunakan bahan pelarut yang sama. Filtrat kemudian disaring dan didapatkan filtrat yang ke II. Setelah itu dilakukan pencampuran dari filtrat I dan II kemudian dilakukan penguapan pada suhu  $60^{\circ} - 70^{\circ}\text{C}$  hingga diperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%.

- b. Kemudian ekstrak etanol tanaman sarang semut dilakukan pengenceran menjadi beberapa konsentrasi sesuai yang telah ditentukan yaitu 10% , 25% , 50% , 75% , 100% menggunakan etanol 70%.

#### 4. Pembuatan obat kumur

Tanaman sarang semut yang telah diekstrak di laboratorium kemudian dibuat dalam bentuk obat kumur.

Tabel 1. Formula Obat kumur (Jones, 2014)

Bahan	Formula I 10%	Formul a II 25%	Formul a III 50%	Formul a IV 75%	Formul a V 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 (ml)	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
	60	60	60	60	60

##### a. Formula I

Ekstrak tanaman sarang semut konsentrasi 10% sebanyak 5 ml dan Na-lauril sulfat 1 ml yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml menggunakan tabung *Erlenmeyer*. *Peppermintoil* 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 ml yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml menggunakan tabung *Erlenmeyer*. *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.

c. Formula III

Ekstrak tanaman sarang semut konsentrasi 50% sebanyak 25 ml dan Na lauril sulfat 1 ml yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml menggunakan tabung *Erlenmeyer*. *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 ml yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml

menggunakan tabung *Erlenmeyer*. *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 ml yang masing-masing dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml menggunakan tabung *Erlenmeyer*. *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.

5. Pembiakan jamur *C.albicans*

Koloni jamur *C.albicans* disubkultur dalam lempeng agar TSA selama 24 jam pada suhu 37°C. Beberapa koloni jamur diambil dengan menggunakan ose steril lalu dimasukkan ke dalam NaCl sebanyak 1-2 ml lalu diinkubasikan selama 2-4 jam pada suhu 37°C.

Larutan yang berisi jamur tersebut kemudian dihitung menggunakan spektrofotometer untuk penghitungan jumlah koloni jamur dengan pembacaan melalui cahaya yang diserap dengan panjang gelombang 595nm.

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

Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan cara dimasukkan ke dalam *Brain Heart Infusion* (BHI) hingga diperoleh jumlah kuman yang sesuai dengan jumlah larutan Standar Brown III dengan konsentrasi kuman  $10^8$  CFU/ml. Karena uji yang dilakukan dengan menggunakan metode dilusi cair, larutan diencerkan lagi hingga  $10^6$  CFU/ml.

#### 6. Uji Aktivitas Daya Antimikroba

Uji daya antimikroba ekstrak tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens*) dengan metode pengenceran tabung (*tube dilution method*) sebagai berikut:

a. Disediakan 36 tabung steril dengan 3 kali pengulangan, dimana setiap pengenceran dalam satu kali pengulangan menggunakan 5 tabung dan 2 tabung untuk sisa pengenceran, kontrol pertumbuhan kuman (kontrol positif) dan kontrol *chlorhexidine gluconat* (kontrol negatif). 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 (2 untuk kontrol):

- 1) Tabung I diisi 1 ml Formula I + 1 ml suspensi jamur *C.albicans*  $10^6$  CFU/ml.
- 2) Tabung II diisi 1 ml Formula II + 1 ml suspensi jamur *C.albicans*  $10^6$  CFU/ml.
- 3) Tabung III diisi 1 ml Formula III + 1 ml suspensi jamur *C.albicans*  $10^6$  CFU/ml.
- 4) Tabung IV diisi 1 ml Formula IV + 1 ml suspensi jamur *C.albicans*  $10^6$  CFU/ml.
- 5) Tabung V diisi 1 ml Formula V + 1 ml suspensi jamur *C.albicans*  $10^6$  CFU/ml.
- 6) Tabung VI diisi 1 ml *Chlorhexidine gluconate* 0.2%+ 1 ml suspensi jamur *C.albicans*  $10^6$  CFU/ml (kontrol -)
- 7) Tabung VII diisi 1 ml formula dasar obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut konsentrasi 0% + 1 ml suspensi jamur *C.albicans*  $10^6$  CFU/ml (kontrol +)
8. Tabung VIII diisi 1 ml *Chlorhexidine gluconate* 0.2%+ 1 ml suspensi jamur *C.albicans*  $10^6$  CFU/ml (kontrol -).
9. Tabung IX diisi 1 ml formula dasar obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut konsentrasi 0% + 1 ml suspensi jamur *C.albicans*  $10^6$  CFU/ml (kontrol +)

c. Semua tabung selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$

- d. Pengamatan dilakukan setelah proses inkubasi selama 24 jam selesai untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan jamur *C.albicans* dengan cara membandingkan kadar kekeruhan dengan kontrol positif.
- e. Kadar hambat minimal (KHM) didapat dengan mengamati tabung subkultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan jamur 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 TSA diinkubasi lagi selama 18-24 jam pada suhu 37°C
- h. Kadar bunuh minimal (KBM) akan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan jamur pada media TSA pada konsentrasi terendah.

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

Pembacaan nilai didasarkan pada :

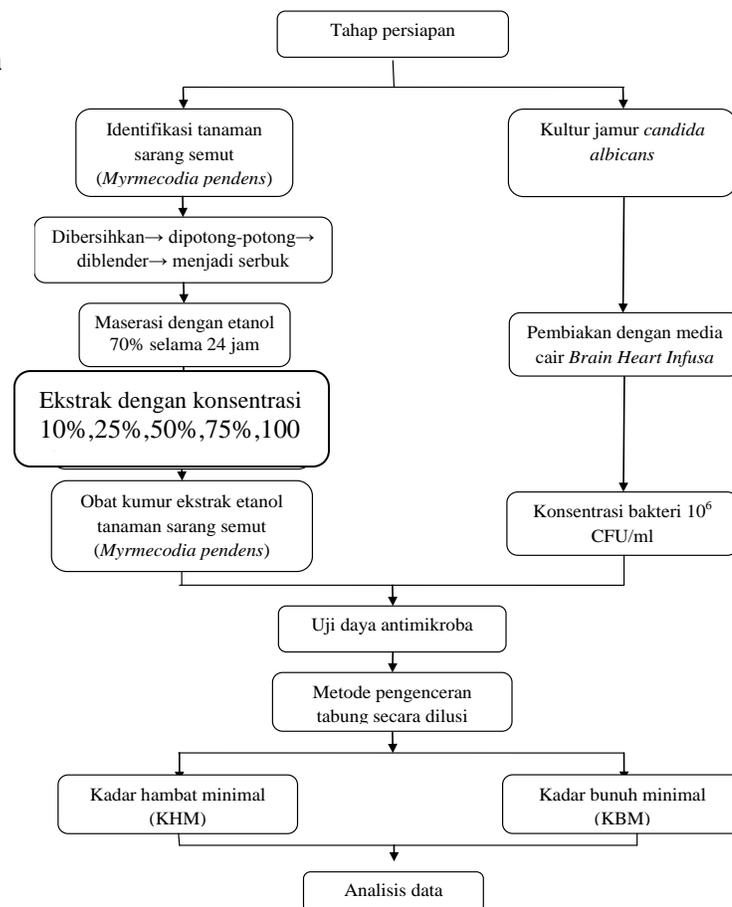
- b. Tanda negatif (-) : dengan melihat adanya kejernihan pada tabung menunjukkan tidak adanya pertumbuhan jamur *C.albicans* sehingga obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut dapat menghambat pertumbuhan jamur.
- c. Tanda positif (+) : dengan melihat adanya kekeruhan pada tabung menunjukkan adanya pertumbuhan jamur *C.albicans* sehingga obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut tidak dapat menghambat pertumbuhan jamur.

- d. Pembacaan KBM dapat ditentukan dengan menguji bahan menggunakan konsentrasi terkecil dari bahan uji yang masih dapat membunuh jamur. Hal ini ditunjukkan dengan ada tidaknya pertumbuhan koloni jamur *C.albicans* pada media TSA

### G. Analisa Data

Analisis data untuk mengukur KHM dan KBM dari obat kumur ekstrak etanol tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens*) menggunakan uji deskriptif terhadap jamur *C.albicans*

### H. Alur penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian