

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Metode penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental. Penelitian eksperimental merupakan suatu penelitian kuantitatif dengan melakukan kegiatan percobaan eksperimental tertentu (Notoatmodjo, S, 2018). Pada penelitian ini menggunakan kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dilakukan maserasi untuk menghasilkan ekstrak kental. Hasil dari ekstraksi dibuat menjadi *mouthwash* minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 1%, 2%, 3% dan di uji sediaan *mouthwash* minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan pengujian sifat fisik yaitu sedimentasi, organoleptis, pH, viskositas setelah itu dilakukan uji aktivitasnya terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

#### **B. Lokasi Penelitian**

1. Minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang bersertifikat (COA) didapatkan dari CV. Pavettia Wangi Atsiri.
2. Analisis komponen minyak atsiri dengan GC-MS dilakukan di Laboratorium Kimia Riset FMIPA Universitas Negeri Semarang.
3. Pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

4. Pembuatan sediaan *mouthwash* minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan uji evaluasi sediaan dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
5. Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* menggunakan metode difusi cakram dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

### **C. Subyek Penelitian**

Pada penelitian ini digunakan minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diperoleh dari CV. Pavettia Wangi Atsiri dan ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diperoleh dari maserasi dilakukan pengujian aktivitasnya terhadap *Streptococcus mutans*.

### **D. Definisi Operasional**

1. Minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

Minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari CV. Pavettia Wangi Atsiri.

2. Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari maserasi menggunakan etanol 96% selama 5 hari dan remaserasi 2 hari.

3. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode difusi cakram.

#### 4. *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi FK Universitas Diponegoro.

### E. Pengumpulan Data

#### 1. Alat :

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu neraca analitik (excellent), mortar dan stemper, pengayak no.40, kaca arloji, kertas perkamen, cawan porselen, cawan petri, beaker glass, nampan, batang pengaduk, *waterbath* (faithful), corong (iwaki), pH digital (starter 3100), kain kasa, gelas ukur (iwaki), beaker glass (iwaki), , erlenmayer (iwaki), sudip, spatula, blender, wadah *mouthwash*, mikropipet (socorex), pipet tetes, pembakar bunsen, jangka sorong, mikropipet, jarum ose, autoklaf (hirayama), oven (binder), *rotary evaporator* (RE 2000E), *hot plate* (maspion), inkubator (binder), tanur, jangka sorong, kaca preparat, mikroskop, penjepit tabung, tabung reaksi (iwaki) dan rak tabung reaksi, kapas, *Mc. Farland* densitometer (biosan), *vortex mixer* (D-LAB), *Viscometer Brookfield DV2T*.

#### 2. Bahan :

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu minyak atsiri dan ekstrak kulit jeruk nipis, gliserin, Na. sakarin, Na. benzoate, tween 80, aquadest, media MHA, asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), asam asetat glasial, pereaksi dragendroff, pereaksi mayer, pereaksi wagner, gram A, gram B, gram C, gram D, kertas cakram dan NaCl 0.9 %.

## F. Prosedur Penelitian :

### 1. Minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

Minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) didapatkan dari CV. Pavettia Wangi Atsiri.

### 2. Skrining fitokimia

#### a. Ekstrak

#### 1) Uji Flavonoid

Sebanyak 5 mL ekstrak yang dilarutkan dalam etanol kemudian ditambahkan serbuk Mg dan ditetesi HCl pekat 5 tetes. Bila hasilnya berwarna merah atau kuning atau jingga berarti positif mengandung flavonoid (Novriyanti *et al.*, 2022).

#### 2) Uji Alkaloid

Masing-masing ekstrak dilarutkan dalam pelarut etanol kemudian hasil yang diperoleh disaring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian masing-masing 5 mL lalu ditambahkan dengan 3 pereaksi (Mayer, Wagner, Dragendrof). Pada penambahan pereaksi Mayer, positif mengandung alkaloid jika membentuk endapan putih atau kuning. Pada penambahan pereaksi Wagner, positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan coklat. Pada penambahan pereaksi Dragendrof, mengandung alkaloid jika terbentuk endapan jingga. Positif Alkaloid apabila dua atau tiga bagian terdapat endapan yang dimaksud (Novriyanti *et al.*, 2022).

### 3) Uji Steroid dan Terpenoid

Sebanyak 5 mL ekstrak yang dilarutkan dalam etanol ditambahkan dengan pereaksi Lieberman-Bouchard. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya terpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Novriyanti *et al.*, 2022)

### 4) Uji Tanin

Sebanyak 5 mL ekstrak yang dilarutkan dalam etanol ditambahkan dengan pereaksi FeCl<sub>3</sub>. Ekstrak yang mengandung Tannin akan berwarna biru atau hijau kehitaman (Novriyanti *et al.*, 2022)

### 5) Uji Saponin

Ekstrak etanol dari masing-masing sampel ditambahkan 10 ml air suling panas dan dilarutkan terlebih dahulu sambil dipanaskan dalam penangas air kemudian dikocok kuatkuat. Bila tidak terbentuk buih berarti negatif, namun bila tetap berbuih setelah didiamkan selama 10 menit kemudian ditambahkan HCl 2 N diperoleh buih tersebut tidak hilang, maka positif mengandung saponin (Novriyanti *et al.*, 2022)

## 4. Analisis komponen minyak atsiri dengan GC-MS

Sebanyak 0,10 µL minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diinjeksikan dengan menggunakan syringe ke dalam tempat GC-MS dengan kondisi operasional sebagai berikut: suhu kolom 50°C,

suhu injeksi 280°C, mode split 1.00, jenis kolom SH-Rxi-5Sil MS (Crossbond, 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane, penyangga fused silica), panjang kolom 30 m, tekanan 26,7 kPa, total aliran 72,1 mL/min, laju alir kolom 0,68 mL/min, kecepatan linier 30.0 cm/sec, aliran tusukan 3.0 mL/min, suhu kolom 50-280°C dengan kenaikan suhu 3°C/menit, suhu sumber ion 220 °C, suhu antarmuka 250°C, jenis pengionan Electron Impact (EI), dan gas pembawa yang berupa Helium (Stiawan, 2022)

## 5. Formula

Formula *mouthwash* minyak atsiri dan ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terdapat pada tabel 3.1 dan pada tabel 3.2

Tabel 3.1 Formulasi *Mouthwash* Minyak Atsiri Kulit Jeruk Nipis

Bahan	Fungsi	Konsentrasi %		
		F1	F2	F3
Minyak atsiri kulit jeruk nipis	Zat aktif	1	2	3
Tween 80	Emulgator	7,5	7,5	7,5
Gliserin	Humektan	5	5	5
Na. Benzoat	Pengawet	0,4	0,4	0,4
Na. Sakarin	Pemanis	1	1	1
Aquadest ad	Pelarut	100	100	100

Tabel 3.2 Formulasi *Mouthwash* Ekstrak Kulit Jeruk Nipis

Bahan	Fungsi	Konsentrasi %		
		F1	F2	F3
Ekstrak kulit jeruk nipis	Zat aktif	1	2	3
Tween 80	Emulgator	7,5	7,5	7,5
Gliserin	Humektan	5	5	5
Na. Benzoat	Pengawet	0,4	0,4	0,4
Na. Sakarin	Pemanis	1	1	1
Aquadest ad	Pelarut	100	100	100

Formula ini modifikasi dari penelitian sebelumnya (Justicia, *et al.*, 2017).

#### 6. Pembuatan *mouthwash* minyak atsiri kulit jeruk nipis

Proses pembuatan diawali dengan penimbangan bahan-bahan yang akan digunakan dalam pembuatan sediaan *mouthwash* minyak atsiri kulit jeruk nipis, lalu kalibrasi botol wadah sediaan *mouthwash* dan ditandai. Bahan yang digunakan yaitu minyak atsiri kulit jeruk nipis, gliserin, Na. sakarin, Na. benzoat, tween 80, dan aquadest. Pada tahap pertama fase air dan bahan yang larut air disiapkan yaitu aquadest, Na. Benzoat, Na. sakarin, tween 80, serta gliserin, kemudian bahan yang tidak larut air yaitu minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), fase ini kemudian dicampurkan bersama sambil diaduk hingga larut lalu disaring dan dimasukkan dalam botol bening. *Mouthwash* minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang dihasilkan diuji mutu fisiknya.

#### 7. Pembuatan *mouthwash* ekstrak kulit jeruk nipis

Proses pembuatan diawali dengan penimbangan bahan-bahan yang akan digunakan dalam pembuatan sediaan *mouthwash* ekstrak kulit jeruk nipis, lalu kalibrasi botol wadah sediaan *mouthwash* dan ditandai. Bahan yang digunakan yaitu minyak atsiri kulit jeruk nipis, gliserin, Na. sakarin, Na. benzoat, tween 80, dan aquadest. Pada tahap pertama fase air dan bahan yang larut air disiapkan yaitu aquadest, Na. Benzoat, Na. sakarin, tween 80, serta gliserin, dan ekstrak kulit jeruk nipis. Fase ini kemudian dicampurkan bersama sambil diaduk hingga larut lalu disaring dan dimasukkan dalam botol bening. *Mouthwash* minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang dihasilkan diuji mutu fisiknya.

## 8. Evaluasi sediaan *mouthwash*

### a. Uji sentrifugasi

Uji sentrifugasi dilakukan untuk melihat kestabilan mekanik sediaan. Uji ini menggunakan sentrifuge. Sediaan obat kumur 5 mL dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Hasil sentrifugasi dapat diamati dengan adanya pemisahan atau tidak (Djafar *et al.*, 2021).

### b. Uji organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan melihat kejernihan, mencium bau dan warna dari *mouthwash* yang dibuat (Justicia, *et al.*, 2017).

### c. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter dengan cara menyelupkan pH meter ke dalam sediaan, setelah itu dilihat hasilnya dan dicatat (Suryani *et al.*, 2019).

### d. Uji viskositas

Uji ini diukur dengan menggunakan viskometer Brookfield dengan kecepatan putar *spindle* diatur pada kecepatan 100 rpm dan menggunakan spindle no. 61. Sebanyak 50 mL sampel dimasukkan ke dalam *beaker glass*. *Spindle* dicelupkan ke dalam sampel dan tekan tombol *start* untuk memulai pengukuran dan dicatat hasil pengukurannya. (Sulistiyono *et al.*, 2022).

## 9. Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans*

Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* menggunakan pemeriksaan langsung pewarnaan gram. Pewarnaan gram merupakan salah satu prosedur yang paling banyak digunakan untuk mencirikan bakteri. Dari pewarnaan gram dapat diketahui morfologi sel antara lain sifat gram, bentuk sel serta penataan sel dan bakteri gram negatif berwarna merah, sedangkan bakteri gram positif berwarna ungu. Perlakuan yang dilakukan yaitu: kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen, kemudian diambil bakteri dengan jarum ose secara aseptik dan dioleskan pada kaca objek lalu ditetesi dengan gram A (ungu violet) dan dibiarkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Bakteri tersebut ditetesi lagi dengan gram B (larutan iodine) dan dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Selanjutnya ditetesi lagi dengan gram C (alkohol) didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir, dianginkan dan dikeringkan setelah itu dilakukan penetesan gram D (safranin) selama 1 menit setelah itu dicuci dengan air mengalir dikeringkan lalu dilakukan pengamatan di bawah mikroskop (Salsabila, 2023).

## 7. Uji aktivitas antibakteri *mouthwash*

### a. Sterilisasi

Pada uji antibakteri perlakuan harus dalam keadaan steril, untuk itu semua alat dan bahan yang digunakan harus dalam keadaan

steril. Tujuan dari sterilisasi yaitu untuk membunuh mikroorganisme yang ada pada alat, karena dikhawatirkan akan mengganggu jalannya penelitian. Sterilisasi dilakukan di dalam oven pada suhu 180°C selama 180 menit (Handayani, *et al.*, 2017).

b. Pembuatan media agar miring

Sebanyak 5 mL media *Mueller Hinton Agar* dituangkan masing-masing pada 3 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama  $\pm 30$  menit sampai media memadat pada kemiringan 30°. Media agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Handayani, *et al.*, 2017).

c. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Dimasukkan 3,8 gram media MHA ke dalam Erlenmeyer, dilarutkan dengan 100 mL air suling yang diikuti dengan pemanasan dan pengadukan lalu disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Handayani, *et al.*, 2017)

d. Inokulasi bakteri pada media agar miring

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Handayani, *et al.*, 2017).

e. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan jarum ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* 0,5 menggunakan *Mc. Farland* densitometer yang sebelumnya dihomogenkan menggunakan vortex mixer (Handayani, *et al.*, 2017).

f. Perendaman kertas cakram pada *mouthwash*

Siapkan 9 cawan petri untuk proses perendaman kertas cakram, masing-masing direndam ke dalam sampel yaitu F1, F2, F3, kontrol negatif (tanpa minyak atsiri kulit dan ekstrak kulit jeruk nipis) dan kontrol positif (*Mouthwash* komersial). Kertas cakram yang digunakan direndam ke dalam keseluruhan cawan petri selama 30 menit kemudian dikeringkan dengan ditiriskan untuk selanjutnya digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* (Handayani, *et al.*, 2017).

g. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram

Diawali menyiapkan 9 cawan petri dibagi menjadi 3 bagian (F1, F2, F3, kontrol negatif (tanpa minyak atsiri kulit jeruk nipis) dan kontrol positif (*mouthwash* komersial), lalu disiapkan kertas cakram/paper disc dan direndam ke dalam setiap sampel *mouthwash*, kontrol positif dan negatif, lalu kertas cakram yang telah direndam tersebut diangkat dan diletakkan di wadah lainnya. Kemudian cawan petri diisi 1 mL suspensi yang telah sesuai dengan standar kekeruhan

larutan *Mc. Farland* menggunakan mikropipet, lalu ditambahkan 15 ml MHA ke dalam masing-masing cawan petri dan tunggu hingga memadat, lalu diletakkan kertas cakram yang sudah direndam pada sampel ke dalam 9 cawan petri yang sudah berisi media MHA dan suspensi bakteri, lalu ditutup cawan petri, dan disterilkan pinggiran tutup cawan petri menggunakan pembakar bunsen, setelah itu diinkubasi menggunakan inkubator dengan suhu 37°C selama 24 Jam. Kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi sampel menggunakan jangka sorong lalu catat hasil pengukurannya. (Handayani, *et al.*, 2017).

#### 8. Pengukuran diameter zona hambat

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam inkubasi. Adanya aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram/*paper disc* yang menandakan adanya efek hambat pada bakteri *Streptococcus mutans* (Handayani, *et al.*, 2017). Pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur dengan diameter vertical dan diameter horizontal menggunakan jangka sorong (Magvirah, *et al.*, 2019)

### G. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan analisis univariat yang dilakukan terhadap variabel dari hasil penelitian. Analisis univariat ini hanya untuk menjelaskan dan menghasilkan data deskriptif seperti terkait uji mutu fisik sediaan seperti uji sentrifugasi, organoleptis, pH, viskositas serta hasil

diameter zona hambat terhadap *Streptococcus mutans* lalu data tersebut dianalisis statistic menggunakan SPSS (Notoatmodjo, 2018).