

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji buah pinang (*Areca catechu* L.) yang diambil dari daerah Waimangura, Sumba Barat Daya, Nusa Tenggara Timur.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah biji buah pinang yang diperoleh dari tanaman pinang (*Areca catechu* L.), yang diambil biji buah pinang yang sudah matang dan masih segar dari daerah Waimangura, Sumba Barat Daya, Nusa Tenggara Timur pada bulan Januari.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak biji buah pinang (*Areca catechu* L.) hasil ekstraksi dengan metode maserasi.

Variabel utama yang kedua adalah sediaan obat kumur ekstrak biji buah pinang (*Areca catechu* L.) dengan variasi konsentrasi untuk menghambat bakteri *Streptococcus mutans*.

Variabel utama yang ketiga adalah uji aktivitas antibakteri dengan variasi konsentrasi yang dilakukan dengan metode difusi cakram.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang biasa diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak biji buah pinang yang ditambahkan dalam formula obat kumur.

Variabel tergantung merupakan titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini adalah uji mutu fisik obat kumur.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah jumlah sel bakteri *Streptococcus mutans*, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, pemilihan biji buah pinang, dan metode ekstraksi.

3. Definisi operasional variabel utama

Definisi operasional variabel utama adalah definisi yang didasarkan sifat-sifat atas hal yang dapat diamati dan diperlukan bagi peneliti lain yang akan menguji kembali penelitian ini.

Pertama, biji pinang adalah biji yang diambil dari buah tanaman pinang (*Areca catechu* L.) yang masih segar, sehat dan terbebas dari hama dan penyakit yang tumbuh di daerah Waimangura, Kabupaten Sumba Barat Daya, Nusa Tenggara Timur yang diambil pada bulan Januari 2019.

Kedua, serbuk biji pinang adalah serbuk dari biji pinang yang sudah dikeringkan kemudian digiling dengan mesin penyerbuk.

Ketiga, ekstrak etanol biji pinang merupakan ekstrak yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk biji pinang dengan etanol 70% yang kemudian dipekatkan untuk mendapatkan ekstrak kental.

Keempat, Uji aktivitas antibakteri adalah pengujian antibakteri ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dan sediaan obat kumur biji pinang (*Areca catechu* L.) yang dilakukan dengan metode difusi.

Kelima, uji difusi adalah uji menggunakan cakram dengan konsentrasi 1,5; 3; 4,5% pengukuran aktivitas antibakteri dengan melihat diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dalam media uji.

Keenam, uji mutu fisik adalah metode pengujian mutu sediaan obat kumur ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dengan parameter uji bentuk fisik, kejernihan, viskositas dan pH.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : beaker glass, gelas ukur, botol bermulut lebar, timbangan analitik, sudip, batang pengaduk, *Rotary Evaporator*, *Viskometer cup and bob*, pH meter, oven, ose, kapas lidi steril, petri, *Moisture Balance*, pembakar spirtus, sarung tangan, mikroskop, ayakan, dan *autovortex*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pinang (*Areca catechu* L.) yang diperoleh dari daerah Waimangura (NTT), siprofoksin disk, gliserin, *sodium lauryl sulfate* (SLS), *peppermint oil*, natrium benzoat, natrium sakarin, mentol, aquadestilata, etanol 70%, bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175, media *Blood Agar Plate* (BAP).

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Biji pinang (*Areca catechu* L.) yang diambil dari buah pinang yang berasal dari daerah Waimangura, Sumba Barat Daya, Nusa Tenggara Timur

2. Determinasi tanaman pinang

Tahap pertama penelitian ini adalah dilakukan determinasi tanaman yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel yang akan digunakan dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pinang (*Areca catechu* L.) yang akan digunakan adalah benar dan sesuai dengan pustaka dan dibuktikan di Universitas Setia Budi Surakarta.

3. Pengeringan Bahan

Bahan yang akan dikeringkan yaitu biji pinang yang telah dicuci bersih dengan air mengalir dan ditiriskan, lalu dipotong-potong dan dikering anginkan, kemudian dilanjutkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, mencegah terjadinya perubahan kimiawi dan reaksi enzimatik yang dapat menyebabkan penurunan mutu dan memudahkan

dalam proses pembuatan serta menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri (Ansel, 1989).

4. Pembuatan serbuk biji pinang

Pembuatan serbuk biji pinang dilakukan dengan cara hasil rajangan biji pinang yang sudah kering diserbukkan menggunakan mesin penyerbuk simplisia di Laboratorium Farmasetika Universitas Setia Budi Surakarta. Serbuk biji pinang yang sudah halus diayak dengan pengayak nomor 40 lalu dilakukan penetapan kadar lembab serbuk biji pinang.

5. Penetapan kadar lembab serbuk biji pinang

Penetapan kadar lembab serbuk biji pinang yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Fisik Universitas Setia Budi Surakarta. Penetapan kadar lembab dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 2 gram serbuk biji pinang, lalu diukur kadar lembab dari serbuk dengan menggunakan alat *moisture balance* dengan suhu 105°C. Penandaan hasil analisa setelah selesai yaitu sampai diperoleh bobot konstan yang dilakukan penimbangan sebanyak tiga kali. Kadar susut pengeringan memenuhi syarat dimana suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%.

6. Pembuatan ekstrak etanol 70% biji pinang

Pembuatan ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, yaitu serbuk biji pinang diambil 500 g dimasukkan dalam bejana bermulut lebar berwarna gelap, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 7,5 bagian kedalam bejana tertutup. Dimaserasi selama 5 hari sambil sesekali digojog dan selanjutnya disaring dengan penyaring vakum. Filtrat hasil penyaringan dikumpulkan dan diendapkan selama 1 hari, lalu disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh diuapkan di evaporator hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak yang sudah kental kemudian juga dilakukan penetapan kadar lembab atau susut pengeringan.

7. Penetapan kadar lembab ekstrak biji pinang

Penetapan kadar lembab dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 2 g ekstrak biji pinang, lalu diukur kadar lembab dari ekstrak dengan menggunakan alat *moisture balance* dengan suhu 105°C. Penandaan hasil analisa setelah selesai

yaitu sampai diperoleh bobot konstan yang dilakukan penimbangan sebanyak tiga kali. Kadar susut pengeringan memenuhi syarat dimana suatu ekstrak kental memiliki range susut pengeringan yaitu 5-30% (Voight 1994).

8. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol ekstrak dilakukan dengan cara esterifikasi, dimana ekstrak biji pinang ditambah asam asetat encer dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil positif bila tidak ada bau ester (etil asetat) berarti ekstrak sudah bebas etanol (Depkes 1979). Tujuan dilakukannya uji bebas etanol ini adalah agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri.

9. Identifikasi Kandungan kimia ekstrak etanol biji pinang

Tujuan dari identifikasi kandungan kimia adalah untuk menguji kebenaran kandungan kimia yang ada dalam ekstrak etanol biji pinang. Identifikasi dilakukan di laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

9.1 Penyiapan sampel. Sebanyak 1 gram ekstrak biji pinang ditambah 100 ml air, dididihkan selama 15 menit lalu disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang di peroleh sebagai larutan sampel.

9.2 Pemeriksaan alkaloid. Dimasukkan dalam tabung reaksi 5 ml larutan sampel, di tambah HCl 2%. Larutan dibagi menjadi 3 sama banyak, dalam tabung reaksi I untuk pembanding, tabung reaksi II ditambah 2-4 tetes reagen Dragendrof, adanya alkaloid ditunjukkan dengan adanya kekeruhan atau endapan coklat, tabung reaksi III ditambah 2-4 tetes reagen Mayer, adanya alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan putih kekuningan (Depkes 1977).

9.3 Pemeriksaan flavonoid. Sebanyak 5 ml larutan sampel dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 0,1 gram logam Mg dan larutan HCl 2N, campuran ini dipanaskan selama 5-10 menit, setelah dingin lalu disaring, kedalam filtrat ditambahkan amil alkohol dikocok kuat-kuat, warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Robinson 1995).

9.4 Pemeriksaan polifenol. Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambah dengan 0,5 ml Fehling A+ Fehling B kemudian dipanaskan. Uji positif jika larutan berwarna ungu atau merah bata (Depkes 1977).

9.5 Pemeriksaan saponin. Sebanyak 10 ml larutan sampel dimasukan dalam tabung reaksi lalu di kocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif bila terbentuk buih mantap selama tidak kurang 10 menit setinggi 1-10 cm, buih tidak hilang jika ditambah asam klorida (Depkes 1977).

9.6 Pemeriksaan tannin. Ekstrak ditambah 10 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit lalu disaring. Filtrat yang diperoleh diberi nama larutan B. Sebanyak 5 ml larutan B ditambahkan FeCl_3 , terbentuknya warna violet menunjukkan reaksi positif (Robinson 1995).

10. Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disterilkan terlebih dahulu. Alat seperti tabung reaksi, gelas ukur, dan erlenmeyer ditutup dengan kapas dan dimasukkan dalam kertas perkamen, cawan Petri dibungkus dengan kertas. Semua alat dimasukkan dan disterilkan dengan oven pada suhu 160°C selama 1 jam. Jarum Ose disterilkan dengan nyala api bunsen. Seluruh media pembenihan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit.

11. Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175

11.1 Identifikasi bakteri pada media agar darah. Biakan murni bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175 diinokulasikan pada media BAP (*Blood Agar Plate*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya bakteri berwarna putih dengan tepian koloni berwarna hijau dalam agar darah (hemolisis alfa) (Kusnadi 2003). Terbentuknya zona hemolisis pada permukaan medium agar darah oleh *Streptococcus mutans* ATCC 25175 karena bakteri ini menghasilkan hemolisin, suatu produk ekstraseluler yang dapat melisiskan sel darah merah (Mudatsir 2010).

11.2 Identifikasi secara biokimia. Identifikasi secara biokimia yang dilakukan adalah uji katalase dan koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada larutan BHI (*Brain heart infusion*) dan ditambah H_2O_2 3%. Penambahan H_2O_2 akan terurai menjadi H_2O dan O_2 . Hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara. Hasil positif ditandai dengan adanya

gelembung udara dan hasil negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara. *Streptococcus mutans* ATCC 25175 bersifat katalase negatif sehingga hasil yang terbentuk tidak terdapat gelembung udara (Jawetz *et al* 2013).

Uji tabung digunakan untuk mengetahui adanya koagulase bebas dengan cara 200 µl plasma sitrat dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 1 koloni biakan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diuji ditambahkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampur. Selanjutnya, tabung dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada 4 jam pertama, dan sesudah 18-24 jam. Reaksi positif akan terjadi apabila terbentuk *clot* atau *jelly* dan ketika tabung dimiringkan *jelly* tetap berada di dasar tabung (Lay 1994).

12. Pembuatan Sediaan Obat Kumur

12.1 Rancangan Formula

Tabel 1. Formula obat kumur ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.)

Bahan	Formula I (%)	Formula II (%)	Formula III (%)	Formula IV (%)
Ekstrak biji pinang	0	1,5	3	4,5
SLS	0,5	0,5	0,5	0,5
Gliserin	5	5	5	5
<i>Peppermint oil</i>	5 tetes	5 tetes	5 tetes	5 tetes
Na. Benzoat	0,4	0,4	0,4	0,4
Na. Sakarin	6	6	6	6
Mentol	0,1	0,1	0,1	0,1
Aquadest ad	100	100	100	100

Keterangan :

- Formula I : Obat kumur tanpa ekstrak biji pinang
- Formula II : Obat kumur dengan konsentrasi 1,5%.
- Formula III : Obat kumur dengan konsentrasi 3%.
- Formula IV : Obat kumur dengan konsentrasi 4,5%.

12.2 Cara Pembuatan Obat Kumur. Semua bahan ditimbang, kemudian ekstrak dimasukan dalam cawan porselin, ditambahkan mentol dan *peppermint oil*, diaduk sampai homogen, disebut campuran 1. Dilarutkan Na. sakarin dan Na Benzoat dengan aquadest secukupnya pada wadah lain hingga larut dan homogen, disebut campuran 2. Campuran 1 ditambahkan dalam campuran 2 sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai terbentuk larutan yang homogen, kemudian ditambah *sodium lauryl sulfat* dan di aduk secara perlahan,

kemudian dimasukkan dalam botol dengan volume 100 ml yang telah dikalibrasi dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas.

13. Uji Mutu Fisik Sediaan Obat Kumur

Pengujian mutu fisik sediaan dilakukan dengan cara mengamati bentuk fisik sediaan, kejernihan ekstrak, viskositas sediaan dan pengukuran pH. Pengujian ini dilakukan selama ± 1 bulan.

13.1 Uji bentuk fisik sediaan obat kumur. Pengujian bentuk fisik sediaan obat kumur ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) meliputi aroma, bentuk, dan warna. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengamati semua sediaan dari minggu ke-0 sampai minggu ke-4.

13.2 Uji Kejernihan. Uji kejernihan sediaan obat kumur dilakukan dengan cara sediaan obat kumur dimasukkan dalam botol bening, kemudian obat kumur dilihat di bawah sinar lampu dari arah depan dengan latar belakang putih.

13.3 Viskositas. Uji viskositas dilakukan untuk mengetahui kekentalan obat kumur. Pengukuran viskositas obat kumur diukur dengan menggunakan alat *Viscometer cup and bob*. Pengujian ini dilakukan dengan cara pertama-tama spindle dipasang pada viskotester, selanjutnya larutan dimasukkan dalam cup. Kemudian spindle yang telah terpasang diarahkan secara tegak lurus dengan cup. Viskotester dioperasikan dan diamati jarum jamnya. Angka yang tertunjuk oleh jarum dicatat. Pengukuran dilakukan 3 kali untuk masing-masing formula.

13.4 Pengukuran pH. Salah satu uji sifat kimia sediaan adalah pengukuran pH. Pengukuran pH obat kumur dilakukan dengan cara memasukkan setiap larutan formula dalam beker gelas. Kemudian elektroda pada pH meter dimasukkan ke dalam setiap formula dan dibaca pH larutan pada pH meter. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing larutan dan setiap kali dengan cuplikan baru.

14. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) ini mampu menghambat bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Prinsip metode ini adalah mengukur zona hambatan pertumbuhan

bakteri yang terjadi akibat difusi zat yang bersifat sebagai antibakteri didalam media padat melalui pencadangan.

Ekstrak yang diperoleh dari biji tanaman pinang (*Areca catechu* L.) secara maserasi dengan etanol 70% diuji secara mikrobiologi pada bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Metode yang digunakan yaitu difusi dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat, kemudian diinokulasikan kedalam media *Muller Hinton Agar* (MHA) dengan metode perataan (*Spread Plate Method*). Media didiamkan 10 menit pada suhu kamar, agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Pada media MHA diletakkan 5 cakram yang telah direndam dalam 1 ml ekstrak dari biji pinang (*Areca catechu* L.) yang menggunakan 3 seri konsentrasi yaitu 1,5%, 3%, dan 4,5%, kontrol positif menggunakan antibiotik siprofloksasin dan kontrol negatif menggunakan aquadest steril. Masa inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya. Diameter zona hambat sekitar kertas cakram diukur dan dinyatakan dalam satuan mm. Hasil dapat dilihat dengan adanya area jernih yang mengidentifikasi adanya potensi dapat menghambat oleh ekstrak dari biji tanaman pinang (*Areca catechu* L.) terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Pratiwi 2008).

15. Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Obat Kumur

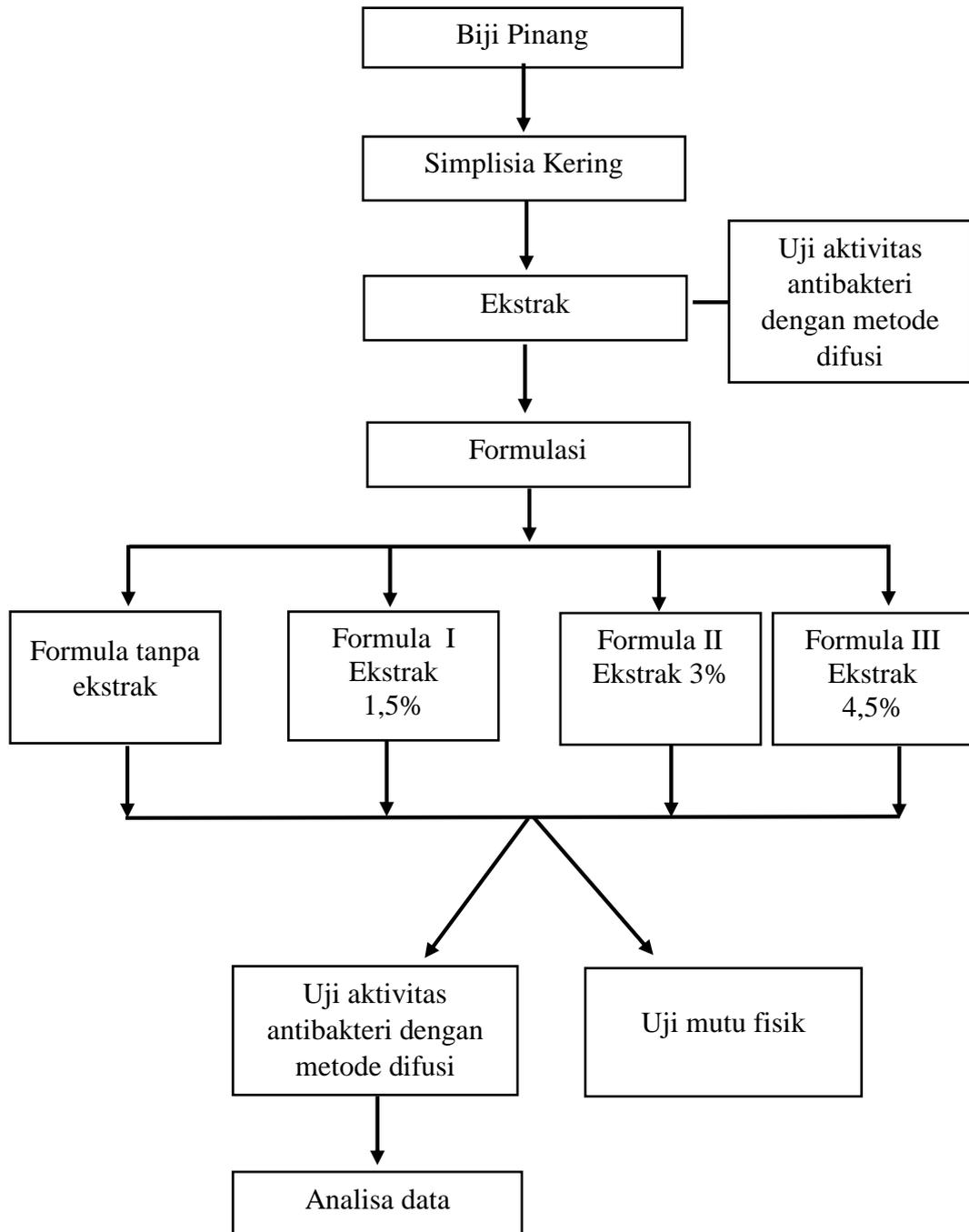
Uji aktivitas antibakteri sediaan obat kumur dilakukan untuk mengetahui apakah sediaan obat kumur ini mampu menghambat bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram.

Formula sediaan obat kumur yang telah dicampur dengan ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dengan berbagai konsentrasi diuji secara mikrobiologi pada bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Pengujian ini menggunakan 3 formula yaitu formula I, formula II dan formula III. Metode yang digunakan yaitu difusi dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat, kemudian diinokulasikan kedalam media *Muller Hinton Agar* (MHA) dengan metode perataan (*Spread Plate Method*). Media didiamkan 10 menit pada

suhu kamar, agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Pada media MHA diletakkan 5 cakram yang masing-masing telah direndam dalam 1 ml formula sediaan obat kumur ekstrak biji pinang dengan seri konsentrasi 1,5% (Formula I), 3% (Formula II), dan 4,5% (Formula III). Kontrol positif menggunakan antibiotik siprofloksasin dan kontrol negatif menggunakan formula tanpa ekstrak. Masa inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya. Diameter zona hambat sekitar kertas cakram diukur dan dinyatakan dalam satuan mm. Hasil dapat dilihat dengan adanya area jernih yang mengidentifikasi adanya potensi dapat menghambat oleh formula sediaan obat kumur dari ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Pratiwi 2008).

E. Analisa Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis secara statistik. Distribusi data diuji menggunakan *Kolmogorov Smirnov* untuk mengetahui data tersebut terdistribusi secara normal atau tidak yaitu jika lebih besar dari 0,05 atau lebih kecil dari 0,05.

E. Alur Penelitian**Gambar 3. Alur Penelitian**