

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan secara eksperimental dan bersifat laboratoris.

#### **B. Tempat dan Waktu**

##### 1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian, Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

##### 2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Februari-Agustus 2017.

#### **C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

##### **1. Variabel Penelitian**

##### a. Variabel penelitian uji sifat fisis sediaan obat kumur

##### 1.) Variabel bebas

Konsentrasi ekstrak daun seledri (*Apium graveolens* L.) dalam sediaan obat kumur.

##### 2.) Variabel tergantung

Sifat fisis sediaan obat kumur.

3.) Variabel terkendali

Volume sediaan obat kumur (10 ml)

b. Variabel penelitian uji antibakteri

1.) Variabel bebas

Konsentrasi ekstrak daun seledri (*Apium graveolens* L.) dalam sediaan obat kumur.

2.) Variabel tergantung

Diameter zona hambat pada uji daya antibakteri

3.) Variabel terkendali

- Suhu inkubator 37°C
- Lama inkubasi 24 jam
- Volume obat kumur (10ml)
- Daun seledri yang digunakan berasal dari tempat yang sama

4.) Variabel tak terkendali

Senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol daun seledri.

## 2. Definisi Operasional

- a. Daun seledri yang digunakan berasal dari tempat yang sama yaitu dipanen dari daerah Muntilan, Jawa Tengah.
- b. Obat kumur ekstrak seledri merupakan sediaan obat kumur yang dibuat dari bahan aktif yaitu ekstrak etanol daun seledri dengan variasi konsentrasi ekstrak daun seledri yang digunakan adalah 12,5%, 15% dan 25%.

- c. Evaluasi sediaan obat kumur ekstrak daun seledri meliputi evaluasi fisis dan efektivitasnya terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.
- d. Uji fisis sediaan obat kumur meliputi uji organoleptik (warna dan bau sediaan), pH dan homogenitas.
- e. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH *indicator strips*.
- f. Uji homogenitas dilakukan dengan pengamatan langsung terhadap sediaan dalam wadah yang bening sehingga mudah diamati.
- g. Pertumbuhan bakteri adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* membentuk koloni bakteri yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- h. Diameter zona hambat adalah area bening yang muncul di sekitar kertas cakram setelah dilakukan uji antibakteri.

## **D. Instrumen Penelitian**

### **1. Alat penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik METTLER TOLEDO®, timbangan skala Lion Star®, kain hitam, tampan, blender, *aluminium foil*, kulkas SAMSUNG®, *waterbath* memmert®, tabung reaksi, *rotary evaporator* IKA®, alat-alat berupa gelas yang lazim (gelas ukur, gelas beker, cawan petri, cawan porselen), toples, mikropipet, kamera Canon®, pH *indicator strips*, kertas saring, kain flannel, kertas label, saringan,

*handscoon*, masker Sensi®, penggaris plastik Butterfly®, tisu Multi®, kaca pengaduk, *magnetic stirrer* CIMAREC®, lampu spiritus, *incubator*, kapas lidi, korek api, *paper disc*, ose, corong Herma®, sendok plastik, sendok stainlessstall, Erlenmeyer PYREX®, *plastic wrap*, bejana elusi CAMAG®, pot salep, tampah bambu, ember Lion Star®, rak tabung, *Laminar Air Flow*, Pinset, kapas, oven memmert®, lampu UV 245 nm dan lampu UV 366nm.

## **2. Bahan penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun seledri (*Apium graveolens* L.), bakteri *Streptococcus mutans*, Etanol 70% Brataco®, HCl, *peppermint oil*, aquades, sorbitol 70%, obat kumur MINOSEP®, Larutan NaCl fisiologis 0,9%, media TSA (*Trypticase Soy Agar*), BHI (*Brain Heart Infusion*), serbuk Zn, plat silica gel GF<sub>254</sub>, HCl 2N, HCl pekat, reagen FeCl<sub>3</sub>, reagen *Liebermann-Burchard*, pereaksi Sitroborat, n-heksan, dan etil asetat.

## **E. Cara Kerja**

### **1. Identifikasi Tanaman**

Identifikasi seledri (*Apium graveolens* L.) dilakukan di Laboratorium Farmasi Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

### **2. Ekstraksi**

Daun seledri yang digunakan dalam penelitian ini dipanen dari daerah Muntilan. Daun dipisahkan dari batangnya kemudian disortir dan dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Daun

seledri segar sebanyak 1 kg yang sudah dicuci bersih ditiriskan dengan tampah bambu, lalu dijemur di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam. Daun yang sudah kering dan tampak kriuk ditimbang. Sedikit demi sedikit daun kering dihaluskan dengan blender. Dari 1 kg daun segar diperoleh simplisia berupa serbuk kering dan halus.

Serbuk halus diekstrak dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Penggunaan etanol sebagai pelarut karena etanol merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan senyawa polar, semi polar dan non polar, serta dapat menghambat kerja enzim dan mengendapkan protein dalam simplisia (Oktavia *et al.*, 2017). Proses maserasi dilakukan selama 3 hari. Rendaman diaduk setiap 6 jam pertama, kemudian pada 18 jam berikutnya didiamkan sampai jenuh. Pengadukan dilanjutkan dengan sekali per hari.

Setelah selesai 3 hari masa perendaman, saring dan pisahkan antara ekstrak cair dan ampas menggunakan kain flannel dan disaring ulang menggunakan kertas saring. Ekstrak cair yang sudah terkumpul disatukan dalam wadah tertutup, kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* dan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental.

### **3. Analisis Zat Aktif**

#### **a. Uji fitokimia dengan reagen**

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan yang berupa uji kualitatif profil kimia. Tujuannya yaitu untuk mengetahui kandungan

metabolit sekunder yang ada dalam ekstrak daun seledri (*Apium graveolens* L.).

#### 1.) Uji kandungan flavonoid

Analisis kualitatif flavonoid dilakukan dengan menimbang 0,5 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 25 ml air hangat. Pisahkan 5 ml filtrat, tambahkan 250 mg serbuk Zn, beberapa tetes HCl 2N dan HCl pekat. Jika terjadi perubahan warna menjadi merah maka positif mengandung flavonoid (Mangunwardoyo *et al.*, 2009).

#### 2.) Uji kandungan saponin

Ambil 0,5 gram ekstrak, larutkan dalam 10 ml aquades. Gojok selama 1 menit dalam tabung reaksi. Amati apakah timbul busa. Jika timbul busa, tambahkan beberapa tetes HCl 1% dan tunggu sampai 10 menit. Apabila busa stabil dalam kurun waktu tersebut maka ekstrak positif mengandung saponin (Karlina *et al.*, 2013)

#### 3.) Uji kandungan tannin

0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 ml air hangat. Bagi dalam 2 tabung. Tabung 1 sebagai pembanding dan 1 lainnya sebagai uji. Tabung uji ditetesi 2 tetes  $\text{FeCl}_3$  0,1N. Jika terjadi perubahan warna menjadi biru hitam atau biru hijau menunjukkan adanya senyawa tannin dalam ekstrak (Mangunwardoyo *et al.*, 2009).

### **b. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Uji dengan metode KLT dilakukan dengan menggunakan fase gerak *n*-heksan:etil asetat (4:1) dan fase diam *silica gel* GF<sub>254</sub> dengan ukuran 3x10 cm. Cara kerja uji dengan metode ini yaitu pertama timbang 0,5 gram ekstrak kental daun seledri, larutkan dalam etanol 70%. Saring filtrat dengan kertas saring. Totolkan filtrat yang sudah disaring dengan pipa kapiler dengan beberapa kali totolan pada ketiga plat silika. Masing-masing plat diberi 2 lokasi totolan yang berjarak 1 cm. Angin-anginkan sampai kering. Buat larutan eluen sebanyak 10 ml dalam bejana elusi yang berupa campuran *n*-heksan:etil asetat (4:1). Berikan kertas saring untuk mengetahui bahwa larutan sudah jenuh. Jika larutan eluen sudah jenuh maka masukkan plat dalam bejana. Tunggu sampai larutan eluen mencapai batas atas plat silika, yaitu 1 cm sebelum ujung plat. Angkat dan keringkan plat.

Hasil dapat diamati dengan melihat warna bercak yang timbul di bawah sinar tampak, sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Bercak dapat diamati lebih jelas dengan dilakukan reaksi penyemprotan. Kemudian hitung nilai *R<sub>f</sub>* nya dengan rumus berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh sampel}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Analisis senyawa dengan KLT terhadap obat kumur ekstrak seledri dilakukan dengan ketentuan sebagai berikut (Winadi, 2017):

1.) Saponin

Fase diam : *silica gel* GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksan:etil asetat (4:1)

Deteksi : sinar UV 254 nm, UV 366 nm, pereaksi *Liebermann-Burchard*

2.) Tanin

Fase diam : *silica gel* GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksan:etil asetat (4:1)

Deteksi : sinar UV 254 nm, UV 366 nm, FeCl<sub>3</sub>

3.) Flavonoid

Fase diam : *silica gel* GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksan:etil asetat (4:1)

Deteksi : sinar UV 254 nm, UV 366 nm, sitroborat

#### 4. Formulasi

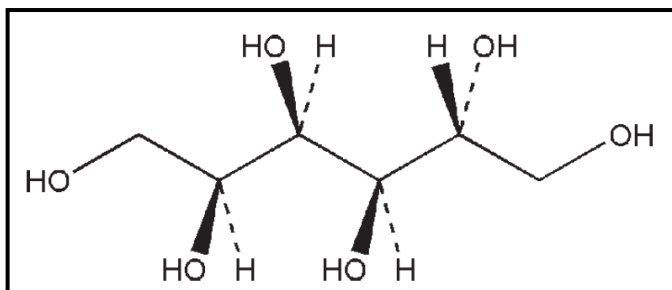
a. Preformulasi

1.) *Peppermint oil*

Bahan ini ditambahkan untuk menutupi rasa yang kurang enak dari bahan lain dalam formula sediaan (Mutmainnah, 2013).



## 2.) Sorbitol



Gambar 4. Struktur formula sorbitol (Rowe *et al.*, 2009)

Sorbitol adalah senyawa kimia yang sering digunakan dalam formulasi. Sorbitol berupa bubuk tidak berbau, putih atau hampir tidak berwarna dan bersifat higroskopis. Bahan ini cenderung kompatibel dengan eksipien lainnya. Biasanya sorbitol digunakan sebagai *humectant*, *plastisizer*, agen penstabil, dan pemanis. Dalam pemakaiannya, sorbitol resisten terhadap pertumbuhan mikroba. Kelarutannya dalam air yaitu 1 dalam 0.5 bagian air. Sebagai campuran dalam pembuatan larutan oral, konsentrasi sorbitol yang diperlukan untuk formulasi adalah 20-35% (Rowe *et al.*, 2009). Sorbitol terbukti dapat mempertahankan kestabilan pH saliva pada pencegahan terjadinya karies gigi (Soesilo *et al.*, 2006).

## 3.) Aquades

Aquades digunakan sebagai pelarut dalam formulasi.

## b. Formulasi Obat Kumur

Tabel 2. Formula Obat Kumur Ekstrak Etanol Daun Seledri (*Apium graveolens* L)

Bahan	F12,5 (12.5%)	F15 (15%)	F25 (25%)
Ekstrak etanol daun seledri (g)	1,25	1,5	2,5
<i>Peppermint oil</i> (ml)	0,1	0,1	0,1
Sorbitol (g)	2	2	2
Aquades ad (ml)	10	10	10
Volume akhir (ml)	10	10	10

Daun seledri yang telah diekstrak diformulasikan ke dalam bentuk sediaan obat kumur. Obat kumur dibuat dalam 3 variasi kadar ekstrak sesuai pada tabel 3.

## 1.) Formula 1 (F12,5)

Ekstrak etanol daun seledri 1,25 gram dilarutkan dalam sorbitol sebanyak 2 ml menggunakan cawan porselen dan sendok *stainless*. Masukkan 0,1 ml *peppermint oil*. Tambahkan 5 ml aquades ke dalam campuran. Pindahkan larutan ke dalam gelas ukur, tambahkan dengan aquades hingga volume 10 ml.

## 2.) Formula 2 (F15)

Ekstrak etanol daun seledri 1,5 gram dilarutkan dalam sorbitol sebanyak 2 ml menggunakan cawan porselen dan sendok *stainless*. Masukkan 0,1 ml *peppermint oil*. Tambahkan 5 ml aquades ke dalam campuran. Pindahkan larutan ke dalam gelas ukur, tambahkan dengan aquades hingga volume 10 ml.

### 3.) Formula 3 (F25)

Ekstrak etanol daun seledri 2,5 gram dilarutkan dalam sorbitol sebanyak 2 ml menggunakan cawan porselen dan sendok *stainless*. Masukkan 0,1 ml *peppermint oil*. Tambahkan 5 ml aquades ke dalam campuran. Pindahkan larutan ke dalam gelas ukur, tambahkan dengan aquades hingga volume 10 ml.

#### c. Uji Karakteristik Fisis Obat Kumur

Evaluasi karakteristik fisik formula akan dilakukan setelah sediaan dibuat yaitu melalui uji organoleptis, pengukuran pH dan homogenitas. Evaluasi karakteristik fisik yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:

##### 1.) Pengamatan organoleptis

Pengamatan organoleptis merupakan uji yang dilakukan secara makroskopis dengan memeriksa warna dan bau sediaan.

##### 2.) Pengukuran pH

Pengukuran pH obat kumur ekstrak daun seledri dilakukan menggunakan pH *strips*. Pemilihan alat ini untuk mengetahui bahwa pH sediaan sesuai dengan syarat pembuatan sediaan obat kumur yaitu pada rentang pH 5-6 (Sakinah *et al.*, 2016).

##### 3.) Homogenitas

Uji ini dilakukan dengan pengamatan secara makroskopis dalam wadah yang bening.

## 5. Uji Efektivitas Obat Kumur

### a. Pemiakkan Bakteri *Streptococcus mutans*

Koloni bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan subkultur dalam agar TSA selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni bakteri yang sudah ditumbuhkan kemudian diambil dengan menggunakan ose steril, masukkan ke dalam NaCl sebanyak 2 ml. Larutan bakteri diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C. Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan cara diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam larutan *Brain Heart Infussion* (BHI) sebanyak 9 ml (Pratiwi, 2017).

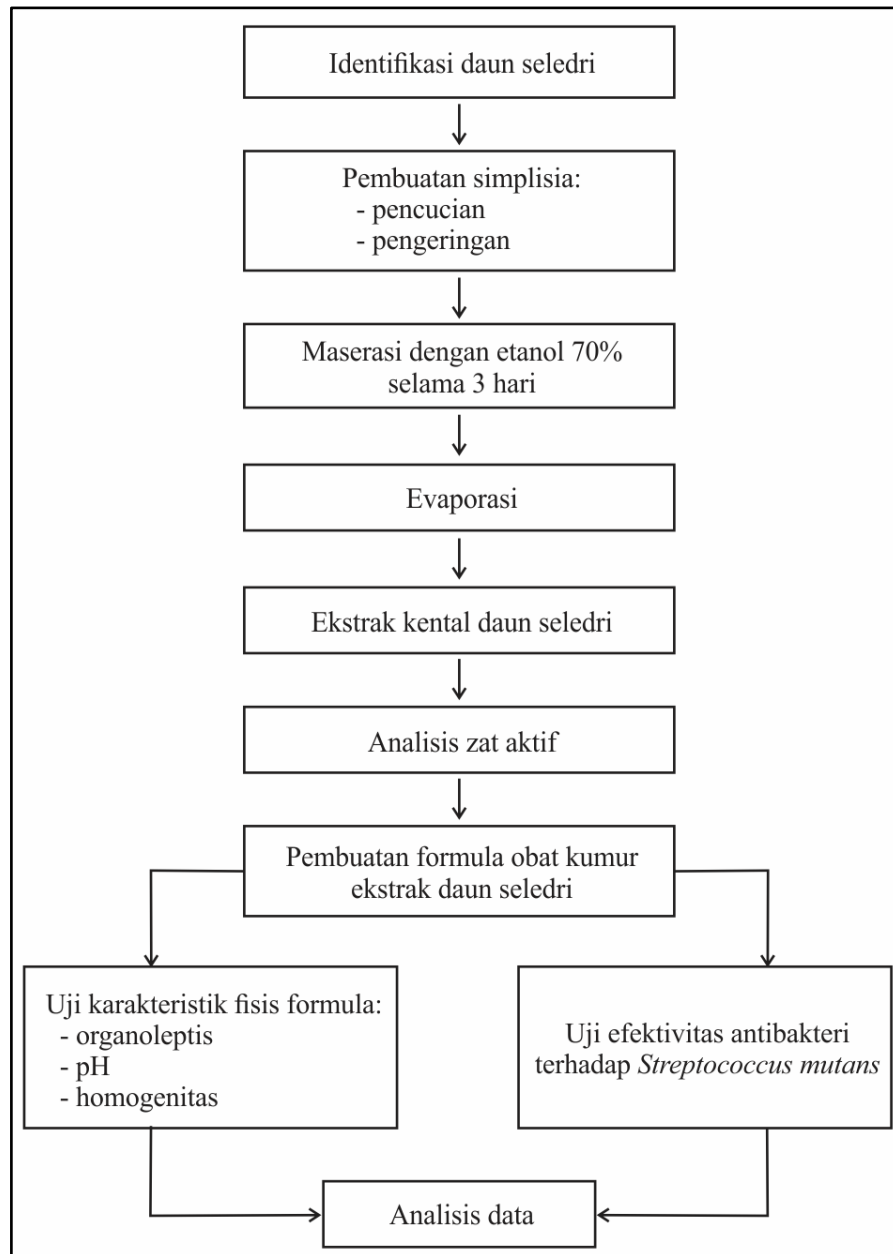
### b. Uji antibakteri

*Laminar Air Flow* (LAF) disiapkan untuk uji antibakteri dan alat yang akan digunakan dalam uji ini disterilkan. Setelah siap, larutan bakteri diusap pada media TSA padat. *Paper disc* direndam pada sampel uji yaitu formula obat kumur ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens* L.) dengan seri konsentrasi yang telah ditentukan untuk kelompok perlakuan. Klorheksidin untuk kontrol pembanding dan formula dasar sebagai kontrol negatif. Selanjutnya *paper disc* ditempelkan pada permukaan media agar. Media yang sudah diberi perlakuan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan melihat zona bening yang muncul di sekitar kertas *paper disc*. Diameter zona hambat diukur

untuk mengetahui efektivitas obat kumur ekstrak etanol daun seledri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

#### F. Skema Langkah Kerja



Gambar 5. Skema Langkah Kerja

## **G. Analisis Data**

Analisis deskriptif dilakukan terhadap data pengamatan uji fitokimia, profil KLT pada komponen senyawa ekstrak etanol, hasil evaluasi karakteristik fisis sediaan obat kumur yang dihasilkan. Hasil pengukuran dari zona hambat pada uji antibakteri dibandingkan antara satu dengan yang lainnya, dengan mengukur diameter zona hambat antibakteri obat kumur ekstrak etanol daun seledri kadar 12,5%, 15%, 25%, dan formula obat kumur yang mengandung klorheksidin. Formula uji teraktif pada uji antimikroba adalah yang memiliki diameter zona hambat terbesar.