

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Jenis dari penelitian ini adalah eksperimental laboratoris menggunakan metode *disc diffusion* untuk melihat pengaruh pasta gigi yang diuji terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

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

Proses ekstraksi kulit buah nanas dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian uji efektivitas antibakteri pasta gigi ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei - September 2017.

#### **C. Subjek Penelitian**

Pasta gigi dasar dengan tambahan konsentrasi ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) 6,25%, 12,5%, dan 25%.

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

##### 1. Variabel Bebas

Pasta gigi ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) konsentrasi 6,25%, 12,5%, dan 25%.

##### 2. Variabel Tergantung

- a. DZI (Diameter Zona Inhibisi) *Streptococcus mutans*.
- b. Hasil uji kualitas pasta gigi.

### 3. Variabel Terkendali

- a. Biakan *Streptococcus mutans*.
- b. Jenis media pembiakan adalah *Brain Heart Infusion* (BHI).
- c. Suhu pembiakan *Streptococcus mutans* (37°C).
- d. Lama pembiakan *Streptococcus mutans* (24 jam).
- e. Sterilisasi alat dan bahan serta suhu ruangan.

### 4. Definisi Operasional

#### a. Ekstrak kulit nanas

Kulit nanas diekstraksi menggunakan etanol 90% dengan metode maserasi sampai didapatkan ekstrak kental.

#### b. *Streptococcus mutans*

Bakteri dibiakkan dalam agar TSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### c. Pasta gigi ekstrak kulit nanas

Formula pasta gigi terdiri dari kalsium karbonat sebagai abrasif, gliserin sebagai pelembab, gum arab sebagai agen pengikat, sorbitol sebagai agen pemanis, akuades sebagai pelarut, *peppermint oil* sebagai perasa, dan bahan aktif ekstrak kulit nanas.

#### d. Daya antibakteri *Streptococcus mutans*

Daya antibakteri *Streptococcus mutans* dilihat dari zona hambat yang terbentuk di sekitar pertumbuhan bakteri pada media agar TSA yang dipermukaannya diletakkan kertas cakram yang sudah direndam dalam pasta gigi ekstrak kulit nanas selama 1 jam secara steril di dalam

*Laminar Air Flow*. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* adalah diameter dimana bakteri tidak tumbuh di sekitar cakram yang ditandai dengan adanya daerah bening yang diukur dengan satuan millimeter.

e. Hasil uji kualitas pasta gigi

Hasil dari uji kualitas pasta gigi diuji dengan uji organoleptik, uji homogenitas, dan uji pH.

## **E. Alat dan Bahan**

### 1. Alat Penelitian

Pada penelitian ini alat yang digunakan antara lain: *aluminium foil*, *beaker glass*, batang pengaduk, gelas ukur, kain flannel, penjepit, *laminar air flow*, lampu spiritus, inkubator, *rotary vacuum evaporator*, cawan petri, kapas lidi steril, jarum ose, kain kasa steril, kapas steril, kertas cakram, kertas label, kertas saring, masker, timbangan, tisu, mikro pipet, penggaris, disk kosong, timbangan digital, wadah berwarna bening, oven.

### 2. Bahan Penelitian

Pada penelitian ini bahan yang digunakan antara lain: ekstrak kulit nanas, akuades, biakan murni *Streptococcus mutans*, medium agar TSA, *Brain Heart Infusion* (BHI), etanol 90%, larutan alkohol, kalsium karbonat, sorbitol, gum arab, *peppermint oil*, gliserin, dan Pepsodent®.

## **F. Cara Kerja**

### **1. Determinasi Tanaman**

Sampel buah nanas diperoleh dari Blitar, Jawa Timur dan dilakukan determinasi tanaman di Universitas Gadjah Mada untuk mengetahui bahwa bahan yang akan digunakan benar yaitu kulit nanas.

### **2. Pembuatan Ekstrak Kulit Nanas**

Kulit nanas dicuci, dipotong kecil-kecil dan di jemur dibawah sinar matahari dan di oven pada suhu 60°C hingga kering. Setelah kering kemudian dijadikan serbuk dengan menggunakan blender. Selanjutnya 220 gram serbuk kulit nanas dimaserasi dengan pelarut etanol 90% selama 3×24 jam (tiap 24 jam dikocok) lalu dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dan dilakukan remaserasi selama 2 hari. Setelah didapatkan maserat, kemudian diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45 °C dan dilakukan pengeringan untuk mendapatkan ekstrak kental kulit nanas dengan menggunakan *waterbath* selama 5 hari. Sehingga didapatkan ekstrak berwarna coklat dengan konsistensi solid.

### **3. Uji Senyawa Ekstrak**

Pembuatan larutan uji senyawa dengan menggunakan ekstrak yang dilarutkan dengan etanol 90%, yaitu :

- a. Uji senyawa flavonoid, dilakukan dengan cara 0,5 gram ekstrak kulit nanas dilarutkan dengan alkohol 96% setelah itu 1 ml larutan ditambahkan dengan logam Mg dan 3 tetes HCl pekat, diamkan selama

1 menit. Jika terjadi perubahan menjadi warna merah oranye hingga merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

- b. Uji senyawa tanin, dilakukan dengan cara 0,5 gram ekstrak kulit nanas dilarutkan dalam 10 ml air panas dan disaring, 5 ml larutan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung kemudian ditetesi dengan 2 tetes besi (III) klorida 2 %, jika terjadi warna biru kehijauan atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

#### 4. Formulasi Pasta Gigi

Pasta gigi ekstrak kulit nanas dibuat sesuai komposisi Volk & Ash (1977). Pada pembuatan pasta gigi ekstrak kulit nanas terlebih dahulu dilakukan optimasi untuk mendapatkan pasta gigi yang bertekstur pasta yang baik. Menurut metode Volk & Ash masih mempunyai tekstur kurang terbentuk pasta (masih terlalu encer) sehingga dilakukan formula optimasi seperti pada Tabel 5. Hasil percobaan diamati secara visual dan dapat ditentukan pasta gigi yang terbaik dari formulasi pada Tabel 4.

**Tabel 1.** Formulasi optimasi pasta gigi ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*)

<b>Bahan</b>	<b>F1 Ekstrak 6,25%</b>	<b>F2 Ekstrak 12,5%</b>	<b>F3 Ekstrak 25%</b>	<b>F4 Tanpa ekstrak</b>
Ekstrak kulit nanas	0,625 gram	1,25 gram	2,5 gram	-
CaCO <sub>3</sub>	4 gram	4 gram	4 gram	4 gram
Gliserin	2,875 gram	2,25 gram	1 gram	3,5 gram
Sorbitol	0,3 gram	0,3 gram	0,3 gram	0,3 gram
Air	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Gum Arab	1 gram	1 gram	1 gram	1 gram
<i>Peppermint oil</i>	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Formula yang akan dibuat sebanyak 10 gram dengan konsentrasi ekstrak kulit nanas 6,25%, 12,5%, dan 25% seperti pada Tabel 4.

Pembuatan pasta gigi sebagai berikut:

Cara pembuatan pasta gigi ekstrak kulit nanas dengan konsentrasi 6,25 % yaitu, pertama kalium karbonat ditimbang seberat 2,8 gram terlebih dahulu ke dalam *mortar* I dan digerus. Setelah halus, 0,3 gram sorbitol ditambahkan kemudian diaduk hingga homogen. Kalium karbonat sebanyak 1,2 gram ditambahkan sedikit demi sedikit sambil terus digerus. Air 1 ml dan gum arab 1 gram dimasukkan dalam *mortar* II, kemudian diamkan 15 menit supaya mengental, setelah mengental aduk hingga homogen dan dimasukkan dalam *mortar* I. Pada *mortar* I tambahkan 0,2 gram *peppermint oil* kemudian diaduk hingga homogen dan ditambahkan 2,875 gram gliserin. Tahap terakhir menambahkan 0,625 gram ekstrak kulit nanas dan diaduk hingga bahan tercampur. Untuk pembuatan pasta gigi ekstrak kulit nanas dengan konsentrasi 12,5% dan 25% dilakukan cara yang sama.

Cara pembuatan pasta gigi ekstrak kulit nanas dalam 10 gram yang mengandung konsentrasi 0 %, 6,25 %, 12,5 %, dan 25 % adalah :

Konsentrasi 0 % : 10 gram pasta gigi dasar.

Konsentrasi 6,25 % : dibutuhkan 0,625 gram ekstrak kulit nanas dalam  
10 gram pasta gigi dasar.

Konsentrasi 12,5 % : dibutuhkan 0,125 gram ekstrak kulit nanas dalam  
10 gram pasta gigi dasar.

Konsentrasi 25 % : dibutuhkan 2,5 gram ekstrak kulit nanas dalam 10 gram pasta gigi dasar.

### **5. Uji Kualitas Pasta Gigi**

- a. Uji homogenitas, dilakukan dengan cara mengamati pasta gigi tanpa ekstrak dan pasta gigi ekstrak kulit nanas dengan konsentrasi 6,25%, 12,5%, dan 25% selama 2 minggu pada suhu kamar. Hal yang diamati yaitu terdapatnya butiran halus pada pasta atau terjadi pemisahan pada pasta gigi.
- b. Uji organoleptik, dilakukan dengan cara mengamati sampel selama 2 minggu penyimpanan pada suhu kamar. Hal yang diamati yaitu aroma, warna, dan tekstur dari sediaan pasta gigi ekstrak kulit nanas dengan konsentrasi 6,25%, 12,5%, dan 25%. Pada tekstur dilihat apakah selama penyimpanan terdapat gelembung udara dan gumpalan kasar, pada aroma terjadi perubahan bau dan dilihat perubahan warna pada pasta gigi.
- c. Uji pH, dilakukan dengan cara mencelupkan kertas pH pada pasta gigi dan dibandingkan dengan pH indikator yang ada. Kemudian dilihat uji pH yang didapatkan sesuai dengan persyaratan kadar pH mutu pasta gigi pada SNI 12-3524-1995, yaitu 4,5-10.

### **6. Uji Antibakteri Pasta Gigi Ekstrak Kulit Nanas**

#### **a. Menyiapkan alat dan bahan**

Seluruh alat yang akan digunakan disterilisasi di dalam *autoclave* selama 30 menit dengan mengatur tekanan sebesar 1,5 atm

dan suhu sebesar  $121^{\circ}\text{C}$  setelah sebelumnya dicuci bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas atau *aluminium foil*.

#### **b. Pembuatan Media**

Pembuatan stok bakteri ini dilakukan untuk memperbanyak dan meremajakan bakteri *Streptococcus mutans*, dengan cara 1 ose biakan murni bakteri *Streptococcus mutans* dipindahkan ke media TSA, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Kertas cakram terlebih dahulu direndam dalam pasta gigi ekstrak kulit nanas selama 1 jam dan bagian ujung pasta gigi dibuang kurang lebih 0,5 cm. Pembuatan suspensi bakteri terlebih dahulu dengan 1 ose bakteri yang telah diremajakan selama 24 jam diambil dan dimasukkan ke dalam BHI (*brain heart infusion*) dan dihomogenkan dengan vortex.

#### **c. Prosedur Uji Daya Antibakteri**

Suspensi bakteri dioleskan pada media TSA padat dengan menggunakan kapas swab steril sampai rata. Kertas cakram yang direndam pada pasta gigi ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*), pasta gigi dasar, dan pasta gigi Pepsodent<sup>®</sup> selama 1 jam dengan konsentrasi yang telah ditentukan untuk kelompok perlakuan yaitu 6,25%, 12,5%, dan 25%. Pasta gigi Pepsodent<sup>®</sup> untuk kontrol positif dan pasta gigi dasar atau tanpa ekstrak kulit nanas sebagai kontrol negatif. Selanjutnya kertas cakram di tempelkan pada permukaan media agar biakan bakteri *Streptococcus mutans* secara steril di dalam *Laminar Air Flow*. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu

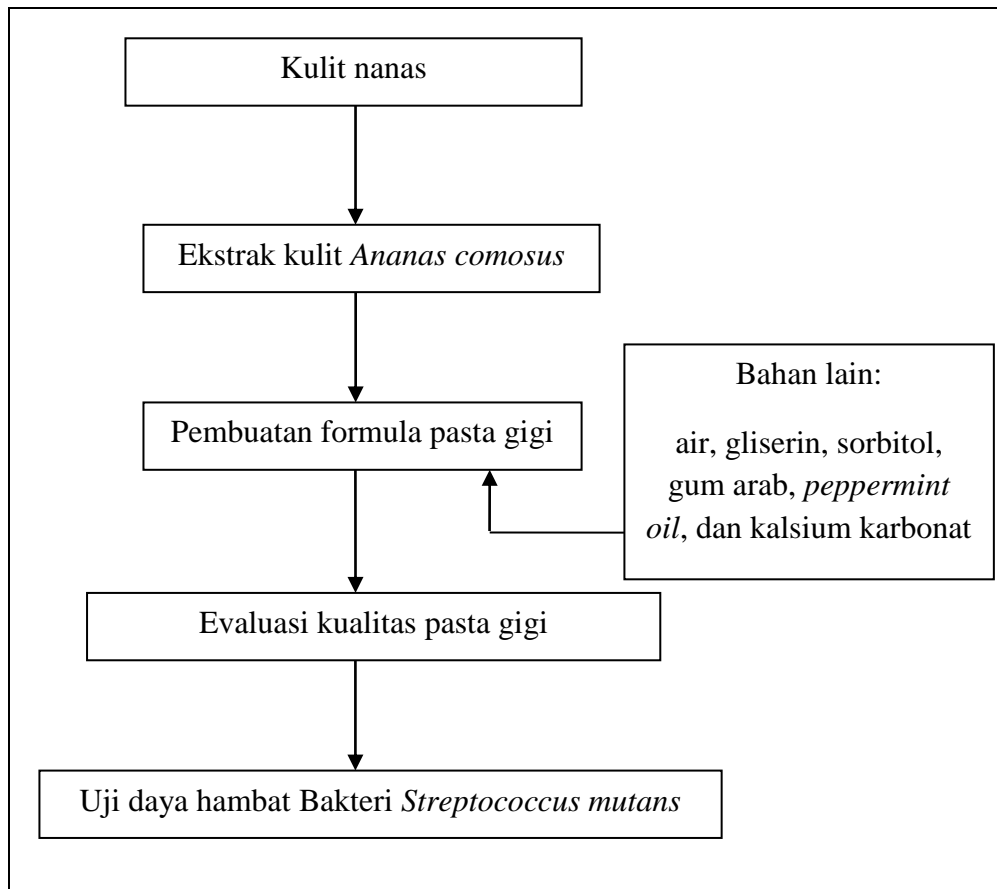


37°C. Hasilnya yaitu dengan melihat zona hambat berupa area bening di sekitar kertas cakram menggunakan penggaris. Kemudian diukur diameter zona hambatnya untuk menguji efektivitas pasta gigi ekstrak kulit nanas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

**d. Tahap pengamatan**

Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, *petri dish* diambil dan diamati. Daerah yang jernih (inhibisi) diukur dengan jangka sorong dan dicatat. Pengukuran daerah inhibisi yaitu dengan cara membalikkan *petri dish* sehingga terlihat daerah hambatan yang tampak transparan, kemudian daerah inhibisi diukur diameternya dengan jangka sorong dan dicatat.

## H. Alur Penelitian



**Gambar 1.** Alur penelitian

## I. Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil uji kualitas formulasi pasta gigi ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) yang terbaik dilakukan analisis deskriptif dan hasil pengukuran DZI (Diameter Zona Inhibisi) juga dilakukan analisis deskriptif untuk mengetahui ada tidaknya efektivitas antibakteri pasta gigi ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Data hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk tabel dan narasi.

