

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik menggunakan metode *disc diffusion* untuk melihat pengaruh pasta gigi yang diuji terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dengan waktu penelitian yaitu pada bulan Mei-September 2017.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang diformulasi menjadi pasta gigi.

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Bebas

Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) konsentrasi 5%, 15%, dan 25%.

2. Variabel Tergantung

DZI (Diameter Zona Inhibisi) dan hasil uji kualitas pasta gigi.

3. Variabel Terkendali

Kondisi daun jeruk purut, media inkubasi dan pembuatan *Streptococcus mutans*, suhu dan waktu inkubasi *Streptococcus mutans*, sterilisasi alat dan bahan serta suhu ruangan

4. Definisi Operasional

a. Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

Daun jeruk purut diekstrak menggunakan etanol 96% dengan metode maserasi sampai didapatkan ekstrak kental.

b. *Streptococcus mutans*

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

c. Pasta gigi daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

Formula pasta gigi merupakan sediaan yang tersusun dari agen moistener serbagai pelembab, agen polishing sebagai penggosok, agen pengikat, agen pemanis, agen pemberi rasa dan bahan aktif ekstrak daun jeruk purut.

d. Daya antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*

Daya antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dilihat dari zona hambat yang terbentuk di sekitar pertumbuhan bakteri pada media agar TSA yang di permukaannya diletakkan kertas cakram yang sudah direndam dalam pasta gigi ekstrak daun jeruk purut

(*Citrus hystrix*) selama 1 jam secara steril di dalam *Laminar Air Flow*. Setelah itu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam dan diukur diameter zona hambatnya. Besar diameter zona hambatnya dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak.

e. Hasil uji kualitas pasta gigi

Hasil dari uji kualitas pasta gigi dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak yang dimasukkan dalam pasta gigi. Uji kualitas yang digunakan yaitu uji organoleptik, uji homogenitas dan uji pH.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Pada penelitian ini alat yang digunakan antara lain: pipet, cawan petri, alat ukur panjang, tabung reaksi, rak tabung, timbangan, kapas swab, pengukur waktu, penggaris, *blank disc*, *aluminium foil*, baki, pinset, busen, vortex, label, inkubator, *Laminar Air Flow*, beaker glass, batang pengaduk, gelas ukur, botol, *rotary evaporator*, oven dan *waterbath*.

2. Bahan

Pada penelitian ini bahan yang digunakan antara lain: daun jeruk purut, *aquadest*, etanol 96%, larutan alkohol, medium TSA, BHI (Brain heart Infusion), CaCO₃, Gliserin, Sorbitol, Gum Arab, *Peppermint oil*, kontrol positif pasta gigi antiplak, logam Mg, HCl pekat, kloroform, pereaksi Dragendorff dan besi (III) klorida 2%.

F. Cara Kerja

1. Pengumpulan dan identifikasi bahan

Pembuatan ekstrak daun jeruk purut diawali dengan dilakukan pengumpulan bahan dari Perkebunan Merapi Farma di Jalan Kaliurang, Yogyakarta. Bahan yang telah dikumpulkan, dilakukan identifikasi bahan terlebih dahulu di Universitas Gadjah Mada untuk mengetahui bahwa bahan yang akan digunakan benar yaitu daun jeruk purut.

2. Pembuatan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

Bahan yang telah diidentifikasi dijemur di bawah sinar matahari dan dikeringkan menggunakan oven serta dihaluskan untuk mendapatkan serbuk daun jeruk purut. Serbuk daun jeruk purut sebanyak 400 gram kemudian dimasukkan ke dalam bejana, ditambahkan etanol 96% sampai serbuk terendam sempurna, kemudian ditutup dengan rapat dan didiamkan selama kurang lebih tiga hari sambil diaduk satu kali sehari. Hasil yang diperoleh disaring dan kemudian ditampung dalam botol. Larutan yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C sampai agak mengental. Setelah itu larutan diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 70°C. Proses ini bertujuan untuk menguapkan etanol sehingga didapatkan ekstrak kental.

3. Identifikasi senyawa dalam ekstrak daun jeruk purut

Pembuatan larutan uji senyawa dengan menggunakan ekstrak yang dilarutkan dengan etanol 96%.

- a. Uji senyawa alkaloid, dilakukan dengan mencampurkan larutan 1 ml dengan 2 ml kloroform dan direaksikan dengan pereaksi Dragendorff, jika terjadi warna merah orange menunjukkan adanya senyawa alkaloid.
- b. Uji senyawa flavonoid, dilakukan dengan cara 1 ml larutan ditambahkan 0,5 gram logam Mg dan 3 tetes HCl pekat. Jika terjadi warna merah orange hingga orange menunjukkan adanya senyawa flavonoid.
- c. Uji senyawa tanin, dilakukan dengan cara 1 ml larutan direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 2%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin.
- d. Uji senyawa minyak atsiri, dilakukan dengan cara 1 ml larutan diuapkan di atas cawan porselin hingga diperoleh residu. Jika ada tercium bau khas yang dihasilkan residu tersebut menunjukkan adanya minyak atsiri.

4. Formulasi pasta gigi

Formula yang akan dibuat sebanyak 10 gram dengan ekstrak daun jeruk purut masing-masing 0%, 5%, 15% dan 25%. Rancangan formula dapat dilihat pada Tabel 2.

Table 2. Rancangan formula yang telah dioptimasi oleh Sari (2014)

BAHAN	F1	F2	F3	F4
Ekstrak daun jeruk	0,5 g	1,5 g	2,5 g	-
CaCO ₃	4 g	4 g	4 g	4 g
Gliserin	2,6 g	1,6 g	0,6 g	3,1 g
Sorbitol	0,3 g	0,3 g	0,3 g	0,3 g
Air	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml
Gum Arab	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
<i>Peppermint oil</i>	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Keterangan :

- F1 = Formula dengan konsentrasi ekstrak daun jeruk purut 5%
- F2 = Formula dengan konsentrasi ekstrak daun jeruk purut 15%
- F3 = Formula dengan konsentrasi ekstrak daun jeruk purut 25%
- F4 = Formula tanpa ekstrak daun jeruk

Cara pembuatan pasta gigi adalah memasukkan sebanyak dua per tiga bagian CaCO₃ dimasukkan ke dalam mortar 1 dan digerus sampai halus. Sorbitol ditambahkan ke dalam mortar 1 dan digerus. Sisa dari CaCO₃ ditambahkan ke dalam mortar 1 dan digerus. Gum Arab dan air dimasukkan ke dalam mortar 2, didiamkan hingga mengembang kurang lebih 15 menit. Setelah mengental diaduk sampai homogen dan dimasukkan ke dalam mortar 1. Gliserin ditambahkan ke dalam mortar 1 dan diaduk hingga homogen. *Peppermint oil* ditambahkan ke dalam mortar 1 dan diaduk hingga homogen. Terakhir ditambahkan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*).

5. Uji kualitas pasta gigi
 - a. Uji organoleptik, dilakukan dengan cara mengamati sampel selama penyimpanan pada suhu kamar. Hal yang perlu diamati yaitu aroma, warna, dan tekstur dari sediaan.
 - b. Uji homogenitas, dilakukan dengan cara mengamati pasta gigi selama 2 minggu pada suhu kamar. Hal yang perlu diamati yaitu terdapatnya butiran-butiran kasar pada pasta atau terjadi pemisahan fase pada pasta gigi.
 - c. Uji pH, dilakukan dengan cara mencelupkan kertas pH pada pasta gigi dan diamati pH yang terjadi.
6. Uji antibakteri pasta gigi ekstrak daun jeruk purut
 - a. Sterilisasi

Semua alat yang akan digunakan pada penelitian ini disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 30 menit yang sebelumnya telah dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan *aluminium foil*.
 - b. Pembuatan stok bakteri

Pembuatan stok dilakukan untuk meremajakan dan memperbanyak bakteri *Streptococcus mutans* yaitu dengan cara memindahkan 1 ose biakan bakteri ke dalam media TSA yang kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator.

c. Perendaman cakram

Kertas cakram terlebih dahulu direndam dalam pasta gigi ekstrak daun jeruk purut selama 1 jam. Bagian ujung pasta gigi dibuang kurang lebih 0,5 cm.

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan mengambil 1 ose bakteri yang telah diremajakan di dalam inkubator, setelah itu dimasukkan ke dalam BHI (*brain heart infusion*) dan diaduk menggunakan vortex sampai homogen. Kemudian suspensi bakteri ditetaskan pada permukaan media TSA dan diratakan pada seluruh permukaan media.

d. Penanaman cakram

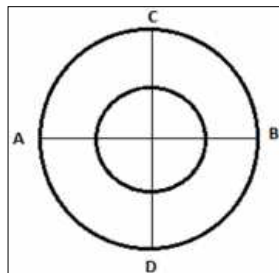
Kertas cakram yang telah direndam menggunakan pasta gigi selama 1 jam ditanam pada permukaan media TSA yang telah ditetaskan bakteri secara steril di dalam *Laminar Air Flow*. Setelah itu media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diukur zona hambat dengan menggunakan penggaris.

Cara ukur : mengukur diameter terluar zona hambat disekitar cakram

Hasil ukur: diameter terpanjang (mm) zona hambat

Skala ukur: rasio

Cara pengukuran zona hambat dapat dilihat pada Gambar 2:



Gambar 2. Cara pengukuran zona hambat

Pengukuran I = AB

Pengukuran II = CD

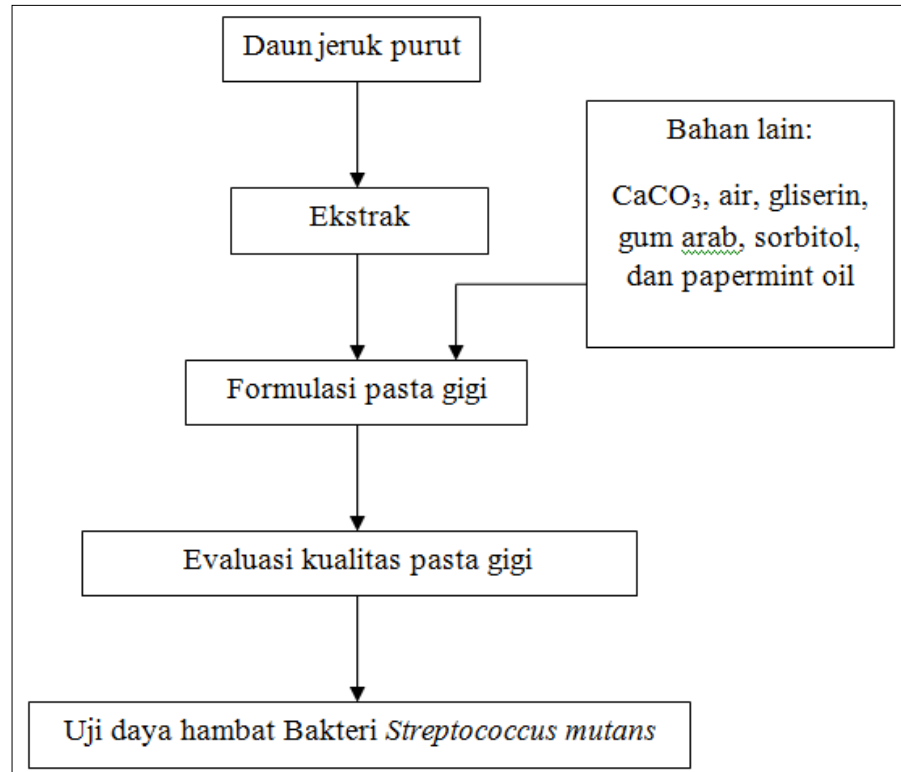
Zona hambat = $\frac{\text{Pengukuran I} + \text{II}}{2}$

Menurut Davis dan Stout, klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri dapat dilihat berdasarkan diameter zona hambat pada Tabel 3.

Table 3. Klasifikasi diameter zona bening dan respon hambat pertumbuhan bakteri (Jannata dkk., 2014)

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Tumbuhan
≥ 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 3. Skema langkah kerja

H. Analisis Data

Evaluasi pasta gigi ekstrak daun jeruk purut dianalisis secara deskriptif dan hasil pengukuran DZI (diameter zona inhibisi) kemudian diuji normalitas datanya menggunakan metode analitik, yaitu uji *Shapiro-Wilk*. Selanjutnya apabila distribusi data normal, data akan dianalisis dengan menggunakan ANOVA. Uji ini digunakan untuk menguji hipotesis-hipotesis komparatif lebih dari dua sampel, yaitu untuk membandingkan tiga perlakuan. Jika data tidak terdistribusi normal maka akan diolah dengan metode *Kruskall-Wallis* yang kemudian dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* dengan $\alpha = 0,05$.