

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Pada penelitian ini bersifat eksperimental. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu (eksperimen). Penelitian ini dilakukan dengan melakukan formulasi sediaan *mouthwash* ekstrak kulit buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) sebagai zat aktif dengan menggunakan variasi konsentrasi ekstrak 0%, 2,5%, 5%, dan 7,5% menggunakan formulasi standar menurut penelitian (Rasyadi, 2018). Kemudian mengevaluasi sediaan *mouthwash* berupa evaluasi organoleptik, homogenitas, pH, stabilitas, uji kesukaan, dan uji aktivitas antibakteri pada sediaan *mouthwash* dengan kontrol positif sediaan yang beredar dipasaran selanjutnya akan dilakukan analisis dengan menggunakan analisis univariat.

#### **B. Subjek Penelitian**

Subjek pada penelitian ini adalah formula dan produk *mouthwash* ekstrak kulit buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) dengan menggunakan konsentrasi ekstrak 0%, 2,5%, 5%, dan 7,5% dengan formula dasar menurut penelitian (Rasyadi, 2018).

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasetika dan Laboratorium Farmakognosi Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang, pada bulan Maret – Juni 2024.

#### **D. Pengumpulan Data**

1. Alat dan Bahan
  - a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, kaca arloji, kertas perkamen, statif dan klem, nampan, cawan porselen, mortir dan stamper, *waterbath*, corong gelas, batang pengaduk, viskometer *Ostwald*, pH meter digital, gelas ukur, *beaker glass*, *erlenmeyer*, tabung reaksi, kain kasa, sudip, spatula, wadah *stainless*, *blender*, pengayak, kertas saring, kertas buram, alumunium foil,

*rotary evaporator, autoklaf, inkubator, oven, hot plate, jarum ose, lidi kapas, cawan petri, pinset, lampu spiritus dan wadah mouthwash.*

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak kulit buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss), gliserin, propilenglikol, natrium sakarin, menthol, *oleum menthae piperitae*, aquades, amil alkohol, HCl (p), magnesium serbuk, biakan *Streptococcus mutans*, etanol 96%, media *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Muller Hinton Agar* (MHA), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, BaCl<sub>2</sub> 1%, NaCl 0,9 %, dan *paper disc*.

2. Prosedur Penelitian

a. Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tangkarakang. Identifikasi makroskopis buah salak berdasarkan (Steenis, 2013) buah salak memiliki ciri-ciri sebagai berikut:

Buah umumnya berbentuk segitiga, bulat telur terbalik, bulat atau lonjong dengan ujung runcing, terangkai rapat dalam tandan buah di ketiak pelepah daun. Kulit buah tersusun seperti sisik-sisik/genteng berwarna coklat kekuningan sampai kehitaman. Daging buah tidak berserat, warna dan rasa tergantung varietasnya. Dalam satu buah terdapat 1–3 biji. Biji keras, berbentuk dua sisi, sisi dalam datar dan sisi luar cembung.

Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui kebenaran dari sampel buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss). Bagian tanaman salak yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buahnya.

b. Pembuatan Simplisia Kulit Salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) (Irma et al. 2023)

- 1) Disiapkan kulit buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) sebanyak 3000 gram dicuci dengan air mengalir hingga bersih.
- 2) Kemudian tiriskan dan keringkan kulit buah salak yang sudah dicuci bersih dibawah sinar matahari.
- 3) Kulit buah salak yang telah kering kemudian ukurannya diperkecil dengan cara dihaluskan dengan cara di *blender*, kemudian di ayak menggunakan ayakan mesh No. 40, lalu dimasukkan ke dalam wadah simplisia.

- c. Pembuatan Ekstrak Kulit Salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss)
- 1) Disiapkan wadah yaitu bejana yang digunakan dalam proses maserasi
  - 2) Dimasukkan 1000 gram serbuk kulit buah salak ke dalam bejana.
  - 3) Kemudian ditambahkan 7000 ml etanol 96% lalu ditutup menggunakan alumunium foil (maserasi).
  - 4) Dilakukan pengadukan sampai benar-benar tercampur, kemudian diamkan selama 2 malam sambil sesekali dilakukan pengadukan.
  - 5) Setelah 2 hari ampas disaring dan pisahkan hasil pada wadah yang berbeda kemudian disimpan.
  - 6) Lalu dilakukan *remaserasi* dengan cara; rendam kembali ampas dengan etanol 96% sebanyak 3000 ml , aduk dan tutup dengan alumunium foil, diamkan selama 3 hari sambil sesekali dilakukan pengadukan.
  - 7) Kemudian disaring kembali hasil remaserasi, filtrat pertama dan kedua dicampurkan.
  - 8) Lalu maserat dipekatan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 30°C - 50°C.
  - 9) Setelah evaporasi selesai, ekstrak dioven kembali dengan suhu 80°C selama 2 jam karena titik didih etanol adalah 80°C. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa etanol 96% yang mungkin masih tersisa dalam ekstrak.
- d. Skrining Fitokimia Flavonoid Pada Ekstrak Kulit Salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss)

Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan dengan 10 mL air panas, didihkan selama kurang lebih 10 menit, kemudian disaring ketika panas. Filtrat yang diperoleh kemudian di ambil sebanyak 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok, dan biarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (cincin).

e. Formula *mouthwash* yang digunakan

**Tabel 3.1 Formula Dasar *Mouthwash* Ekstrak Kulit Salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss)**

Komposisi	Fungsi Bahan	%
Gliserin	Humektan	15
Propilenglikol	Pelarut	10
Natrium sakarin	Pemanis	0,1
Menthol	Penyegar	0,25
Etanol 70%	Pelarut	0,1
Oleum peppermint	Corigen odoris	q.s
Aquadest ad	Pelarut	100

**Tabel 3.2 Formula *Mouthwash* Ekstrak Kulit Salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) Untuk Sediaan 100 mL**

Komposisi	Formula							
	F0		F1		F2		F3	
	%	Volume	%	Volume	%	Volume	%	Volume
Ekstrak	0	0 g	2,5	2,5 g	5	5 g	7,5	7,5 g
Gliserin	15	15 mL	15	15 mL	15	15 mL	15	15 mL
Propilenglikol	10	10 mL	10	10 mL	10	10 mL	10	10 mL
Natrium sakarin	0,1	0,1 g	0,1	0,1 g	0,1	0,1 g	0,1	0,1 g
Menthol	0,25	0,25 g	0,25	0,25 g	0,25	0,25 g	0,25	0,25 g
Etanol 70%	0,1	0,1 mL	0,1	0,1 mL	0,1	0,1 mL	0,1	0,1 mL
Oleum peppermint	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s
Aquadest ad	100	100 mL	100	100 mL	100	100 mL	100	100 mL

**Keterangan:**

Formula F0 : Formula *Mouthwash* dengan konsentrasi ekstrak kulit buah salak 0%

Formula F1 : Formula *Mouthwash* dengan konsentrasi ekstrak kulit buah salak 2,5%

Formula F2 : Formula *Mouthwash* dengan konsentrasi ekstrak kulit buah salak 5%

Formula F3 : Formula *Mouthwash* dengan konsentrasi ekstrak kulit buah salak 7,5%

Fungsi masing-masing dari formula *mouthwash* adalah gliserin sebagai humektan, propilenglikol sebagai zat pelarut atau zat pembawa pada ekstrak yang tidak larut dalam air, natrium sakarin sebagai pemberi rasa manis, menthol sebagai pemberi aroma segar dan terapeutik, etanol sebagai pelarut, oleum menthae piperitae sebagai *corigen odoris*, dan aquadest sebagai pelarut (Rowe, Raymond, 1986).

f. Pembuatan *Mouthwash* Ekstrak Kulit Salak

- 1) Disiapkan alat dan bahan
- 2) Dikalibrasi terlebih dahulu botol wadah *mouthwash* hingga (*ad*) 100 mL dengan cara menggunakan gelas ukur 100 mL tuangkan aquadest sampai 100 mL kedalam gelas ukur lalu masukkan dalam wadah botol, kemudian tandai botol dengan label
- 3) Ditimbang dan diukur masing-masing bahan sesuai dengan formulasi.
- 4) Ekstrak kulit salak dilarutkan dengan *aquadest* kemudian saring menggunakan kertas saring. Kemudian, ditambahkan dengan propilenglikol secukupnya dan gliserin sampai melarut, lalu dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*.
- 5) Dimasukkan menthol ke dalam mortir kemudian ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 2 tetes menggunakan pipet tetes, gerus sampai larut, dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* yang berisi bahan campuran sebelumnya.
- 6) Dimasukkan Na-Sakarín ke dalam *beaker glass* lalu ditambahkan dengan aquadest secukupnya, aduk sampai melarut dengan batang pengaduk, dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* yang berisi bahan campuran sebelumnya.
- 7) Lalu kocok semua bahan sampai homogen, setelah itu dimasukkan ke dalam wadah botol *mouthwash*.
- 8) Ditambahkan aquadest sampai 100 mL ke dalam wadah *mouthwash*
- 9) Digoyangkan wadah yang berisi semua bahan, setelah itu tambahkan oleum *menthae piperitae* secukupnya dan tutup wadah dengan rapat.
- 10) Sediaan *mouthwash* yang sudah jadi, kemudian disimpan ditempat sejuk untuk selanjutnya dilakukan uji evaluasi.

g. Pengulangan

Pada penelitian dilakukan pembuatan sediaan dengan 4 konsentrasi ekstrak kulit buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) yang berbeda yaitu 0% (F1), 2,5% (F2), 5% (F3), 7,5% (F4) dengan 6 kali pengulangan (Hanafiah, 2001:6).

3. Pengujian *Mouthwash*

a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik ini dilakukan oleh peneliti dengan mengamati warna, bau, rasa dan kejernihan pada sediaan *mouthwash* yang telah jadi, melihat konsistensi sediaan berupa cairan kental atau encer, dan mencium aroma yang dihasilkan pada sediaan *mouthwash* meliputi aroma tidak berbau atau memiliki bau yang khas, untuk rasa

mengamati dengan menggunakan indera pengecap apakah sediaan terasa tawar, agak manis, dan manis. untuk melihat warna sediaan yang sudah jadi meliputi hijau kekuningan, kecokelatan, kehijauan. Data dikumpulkan dengan tabel *Checklist*.

b. Uji Homogenitas

Sediaan diamati dengan cara melihat kekeruhan *mouthwash* ekstrak kulit buah salak dan diamati susunan partikel yang terbentuk atau ketidakhomogenan partikel terdispersi dalam *mouthwash* infusa daun salam yang terlihat pada botol sediaan. Pada uji ini teknik pengumpulan data dilakukan dengan metode *checklist* lalu data dimasukkan ke dalam tabel dengan memberi kode 1 = homogen, 2 = tidak homogen.

c. Uji pH

Uji pH dilakukan oleh peneliti dengan mengukur pH sediaan *mouthwash* yang sudah jadi dengan menggunakan pH meter. Uji pH dilakukan dengan cara celupkan pH meter yang sudah dikalibrasi ke dalam sediaan *mouthwash* yang sudah jadi kemudian dilihat dan dicatat angka pH yang tertera. Rentang pH 5,5-7,9 merupakan pH yang diperbolehkan untuk cairan penggunaan mulut atau obat kumur agar aman saat digunakan.

d. Uji Stabilitas

Uji stabilitas dilakukan dengan mengukur beberapa parameter sebelum dan sesudah kondisi dipaksakan. *Mouthwash* masing-masing formula disimpan pada suhu yang berbeda yaitu suhu 4°C dan suhu ruang. Kemudian dilakukan pengamatan organoleptik (warna, bau, rasa, kejernihan, dan pH), dilakukan dengan cara disimpan pada suhu selama 4°C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu ruang selama 24 jam, proses ini dihitung 1 siklus, dan dilakukan sebanyak 6 siklus.

e. Uji Aktivitas Antibakteri

1) Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dan terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan, setelah itu dibungkus dengan kertas buram. Sterilisasi dilakukan dengan oven pada suhu 160 °C selama 1 jam, sedangkan jarum *ose* dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran. Untuk bahan seperti media dan akuades setelah dilarutkan, lalu dimasukkan ke dalam *Erlemeyer*, ditutup dengan kapas dan

aluminium foil, lalu dimasukkan autoklaf dan disterilkan pada suhu 121 °C selama 15 menit.

2) Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

*Muller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 10,2 g dalam 300 mL aquadest kemudian dipanaskan pada *hot plate* hingga larut kemudian ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium foil, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 45 °C – 50 °C dan dituangkan ke dalam cawan *petridisk*.

3) Pembuatan *Nutrient Agar* (NA)

*Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 1 g dalam 50 mL akuades kemudian, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut kemudian ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium foil, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 40 °C – 45 °C kemudian dimiringkan.

4) Pembuatan *Nutrient Broth* (NB)

*Nutrient Broth* ditimbang sebanyak 0,4 g dalam 50 mL akuades lalu, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut kemudian, ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium foil, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 40 °C – 45 °C kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi.

5) Pembuatan Standar *Mac Farland* 0,5

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebanyak 9,95 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampurkan dengan larutan BaCl 1% sebanyak 0,05 mL, lalu dikocok hingga homogen. Sebelum menggunakan kocok terlebih dahulu agar larutan merata.

6) Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil satu mata ose biakan bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diremajakan pada media *Nutrient Agar* (NA) disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL media *Nutrient Broth* (NB) kemudian kocok hingga homogen dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Suspensi bakteri tersebut kekeruhannya dibandingkan dengan larutan standar *Mac Farland* 0,5 apabila suspensi bakteri keruh maka ditambahkan NaCl 0,9% steril,

jika kurang keruh ditambahkan bakteri hingga kekeruhannya sama dengan standar *Mac Farland*.

- 7) Pengujian Aktivitas Antibakteri
  - a) Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan terlebih dahulu.
  - b) Lidi kapas steril dimasukkan ke suspensi bakteri yang sudah disamakan kekeruhannya dengan standar *Mac Farland* 0,5 selama 10 - 15 detik.
  - c) Lidi kapas diangkat dan diperas dengan cara ditekan pada dinding bagian dalam tabung sambil diputar-putar.
  - d) Lidi kapas dipulaskan pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) sampai merata.
  - e) Media yang telah dipulaskan dibiarkan selama 5 - 15 detik agar suspensi bakteri meresap ke dalam media.
  - f) Kemudian dilakukan proses penempelan *disk* yang telah direndam pada kontrol negatif, sediaan *mouthwash* ekstrak kulit buah salak dengan konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, dan 7,5% selama 3 – 10 detik, lalu ditempelkan di atas pulasan bakteri pada media MHA (*Muller Hinton Agar*) dengan menggunakan pinset steril yang dilakukan dengan cara ditekan satu persatu supaya *disk* cakram menempel dengan baik pada media, lalu diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam.
  - g) Diameter zona hambat yang terjadi pada media MHA (*Muller Hinton Agar*) akan diukur dengan menggunakan jangka sorong (dalam satuan mm), kemudian dicatat dan dimasukkan ke dalam tabel pengumpulan data.

#### **E. Pengolahan dan Analisis Data**

##### 1. Pengolahan Data

Pengolahan data dan Analisis Data menurut (Notoatmodjo, 2012) sebagai berikut:

##### a. *Editing*

Pengecekan kembali data yang di dapat dari hasil pengamatan. Pengecekan dilakukan terhadap semua lembar pengujian yang meliputi organoleptik, pH, uji stabilitas, uji kesukaan, dan uji aktivitas antibakteri dengan memeriksa kelengkapan data untuk proses lebih lanjut (Notoatmodjo 2012).

##### b. *Coding*

Setelah data diedit, kemudian dilakukan pengkodean yaitu merubah bentuk kalimat atau huruf menjadi bentuk angka/bilangan guna untuk memudahkan dalam



melakukan analisis. Seperti organoleptik bau dilakukan pengkodean yaitu, 1= tidak berbau, dan 2= bau khas (Notoatmodjo, 2012).

c. *Entrying*

Data yang telah selesai diedit dan diberi kode kemudian data dimasukkan ke dalam program komputer untuk dilakukan pengolahan tabel. Data disesuaikan dengan kode yang sudah diberikan untuk masing masing uji evaluasi seperti, organoleptik, homogenitas, pH, uji stabilitas, uji kesukaan, dan uji antibakteri kemudian dilakukan analisa untuk mendapatkan hasil dalam bentuk persentase (Notoatmodjo, 2012).

d. *Tabulasi*

Membuat tabel-tabel data, sesuai dengan tujuan penelitian. Setelah data dianalisis, hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik. Data pada program komputer pengolah tabel data dibuat dalam bentuk tabel guna mempermudah dalam menganalisis. Kemudian data disajikan dalam bentuk grafik guna untuk mempermudah pemahaman yang lebih dalam (Notoatmodjo, 2012)

2. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan analisis univariat yang dilakukan terhadap masing-masing variabel dari hasil penelitian. Analisis ini menampilkan hasil penilaian berupa nilai rata-rata dari masing-masing variabel untuk menghasilkan distribusi frekuensi dan persentase dari tiap-tiap variable yaitu, organoleptik, homogenitas, pH, stabilitas, kesukaan, dan uji aktivitas antibakteri yang akan dibandingkan dengan literatur (Notoatmodjo, 2012)